

**Zur Entstehung der Schlafstadien und ihrer chronischen
Beeinflussung durch eine pränatale
Glukokortikoidbehandlung zur Förderung der
Lungenreifung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Tobias Groh

geboren am 12. September 1979 in Zwickau

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Matthias Schwab, Jena
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h.c Herbert Witte, Jena
3. Prof. Dr. med. Geert Mayer, Schwalmstadt-Treysa

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. Oktober 2009

Verwendete Abkürzungen und Bezeichnungen

| | |
|------------------|---|
| ECoG | Elektrokortikogramm |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| EMG | Elektromyogramm |
| EOG | Elektrookulogramm |
| GT | Gestationstag |
| Hb | Hämoglobin |
| HPA-Achse | Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse |
| i.m. | intramuskulär |
| i.v. | intravenös |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| Lsg | Lösung |
| MAP | Mikrotubulus assoziierte Proteine |
| MW | Mittelwert |
| n | Anzahl der Tiere |
| NGF | nervaler Wachstumsfaktor |
| NIH | National Institutes of Health |
| O ₂ % | Sauerstoffsättigung |
| PGO | ponto-geniculo-occipital |
| REM | Rapid Eye Movement |
| RDS | Respiratory Distress Syndrom |
| SEF | spektrale Eckfrequenz |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| VF | Vorhersagefehler |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 2.1 | Funktionelle Hirnentwicklung im letzten Drittel der Schwangerschaft | 3 |
| 2.1.1 | Entwicklung von fetalen Verhaltensstadien beim menschlichen Baby | 3 |
| 2.1.2 | Entwicklung zyklischer ECoG-Aktivität im Tiermodell | 5 |
| 2.2 | Pränatale Glukokortikoidtherapie | 6 |
| 2.2.1 | Klinische Bedeutung einer pränatalen Glukokortikoidtherapie | 6 |
| 2.2.2 | Zerebrale Effekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie | 8 |
| 2.2.2.1 | Effekte und Mechanismen einer Glukokortikoidgabe auf die Hirnfunktion beim Adulten | 8 |
| 2.2.2.2 | Akute zerebrale Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung | 9 |
| 2.2.2.3 | Chronische zerebrale Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung | 11 |
| 2.2.2.4 | Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die strukturelle Hirnentwicklung | 13 |
| 3 | Ziele der Arbeit | 15 |
| 4 | Material und Methode | 18 |
| 4.1 | Chirurgische Instrumentierung der Feten | 18 |
| 4.2 | Versuchsablauf und Tiergruppen | 20 |
| 4.3 | Verwendete Glukokortikoide | 22 |
| 4.4 | Datengewinnung | 24 |
| 4.5 | Analyse des Elektrokortikogramms | 24 |
| 4.5.1 | Auswahl geeigneter ECoG-Abschnitte in Abhängigkeit vom Schlafstadium | 24 |
| 4.5.2 | Analyse der Schlafstadiendauer | 26 |
| 4.5.3 | Leistungsspektralanalyse des ECoG's | 26 |
| 4.5.4 | Nichtlineare ECoG-Analyse | 27 |
| 4.6 | Statistische Verfahren | 30 |
| 5 | Ergebnisse | 31 |
| 5.1 | Physiologische Parameter | 31 |
| 5.2 | Entwicklung der Schlafstadien | 31 |
| 5.3 | Einfluss von Glukokortikoiden auf die Schlafstadienentwicklung (Chronische Effekte einer pränatalen Betamethasonbehandlung) | 38 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.4 | Akute Effekte einer pränatalen Betamethasonbehandlung | 45 |
| 5.4.1 | Erster Behandlungszyklus am 106. Gestationstag | 45 |
| 5.4.2 | Zweiter Behandlungszyklus am 112. Gestationstag – Effekte der Vorbehandlung am 106. Gestationstag | 48 |
| 5.4.3 | Dritter Behandlungszyklus am 118. Gestationstag | 53 |
| 5.5 | Einfluss von Betamethason auf die Schlafstadienlänge | 54 |
| 5.5.1 | Chronische Effekte von Betamethason auf die Schlafstadienlänge | 54 |
| 5.5.2 | Akute Effekte von Betamethason auf die Schlafstadienlänge | 56 |
| 6 | Diskussion | 58 |
| 6.1 | Methodische Betrachtungen | 58 |
| 6.1.1 | Das fetale Schaf als tierexperimentelles Modell | 58 |
| 6.1.2 | ECoG-Analyse | 59 |
| 6.2 | Ergebnisdiskussion | 60 |
| 6.2.1 | Die Ontogenese der elektrokortikalen Hirnfunktion | 60 |
| 6.2.2 | Effekte einer Glukokortikoidbehandlung auf die Schlafstadienentwicklung | 65 |
| 6.2.3 | Akute Effekte einer pränatalen Betamethasonbehandlung | 70 |
| 7 | Schlussfolgerungen | 74 |
| 8 | Literatur und Quellenverzeichnis | 77 |
| 9 | Anhang | 92 |
| 9.1 | Danksagung | 92 |
| 9.2 | Ehrenwörtliche Erklärung | 93 |
| 9.3 | Lebenslauf | 94 |

1 Zusammenfassung

Seit Jahrzehnten wird angenommen, dass der undifferenzierte unreife Schlaf aufgrund der Prominenz zum Zeitpunkt der Geburt eine unreife Form des REM-Schlafes ist. Eine neuere Untersuchung bei Ratten lässt im Gegensatz dazu vermuten, dass der undifferenzierte Schlaf keine Frühform des REM-Schlafes ist. Da die zeitliche Abfolge der Entwicklung der Schlafstadien unklar ist, weiß man auch nicht durch die Reifung welcher Hirnstrukturen es zur Differenzierung der Schlafstadien kommt.

Ich untersuchten deshalb in einem ersten Teil die fetale Entwicklung der Schlafstadien anhand der zyklischen Elektrokortikogramm (ECoG) - Aktivität an nichtanästhesierten Schaffeten in utero. Das fetale Schaf ist ein klassisches Modell für die intrauterine Hirnentwicklung, da die fetale Hirnentwicklung ähnlich zu der beim Menschen verläuft. Die Ableitungen wurden zwischen 0,7 und 0,9 der Gestation bei einer Gestationsdauer von 146 Tagen (vergleichbar der 27. bis 35. Schwangerschaftswoche (SSW) bei menschlichen Feten) durchgeführt. Bei menschlichen Feten sind die Schlafstadien in der 36. SSW vollständig ausgeprägt.

Im zweiten Teil der Untersuchungen sollte der Einfluss einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung mit der klinisch zur Lungenreifung verwendeten Dosis Betamethason auf die Entwicklung der Schlafstadien und damit auf die funktionelle Hirnentwicklung untersucht werden. Die pränatale Glukokortikoidtherapie wird klinisch zur Beschleunigung der fetalen Lungenreifung bei Babys, welche von einer Frühgeburt bedroht sind, bis zur 34. SSW eingesetzt. Diese Therapie erhalten ca. 10% aller Schwangeren. In zahlreichen Untersuchungen wurden allerdings akute Effekte von Glukokortikoiden auf das Verhalten sowie Langzeiteffekte auf Kognition, Vigilanz, Gedächtnis und Emotionen belegt. Es wurden nach Randomisierung insgesamt vier Gruppen von Tieren gebildet: eine Kontrollgruppe und je eine Gruppe mit einem einmaligen, zweimaligen und dreimaligen Behandlungszyklus Betamethason. Die Behandlungszyklen erfolgten im Abstand von einer Woche entsprechend der klinischen Praxis ($2 \times 110 \mu\text{g/kgKG}$ Betamethason maternal i.m. und entsprechend 8 mg Betamethason für eine 70 kg schwere Schwangere im Abstand von 24 Stunden) am 106., 112. und 118. Gestationstag (GT). Die ECoG Analyse erfolgte mit linearen (Spektralanalyse) und nichtlinearen Methoden (Berechnung eines Vorhersagefehlers basierend auf der Berechnung des führenden Lyapunov Exponenten zur Bestimmung der Komplexität des Signals). Die Schlafstadien wurden entsprechend der Klinik über das Frequenzspektrum definiert.

Am 106. GT lag ein unreifes ECoG vor, welches weder Eigenschaften des REM- noch des NREM-Schlafes aufwies. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich bereits instabile zyklische

Schwankungen der nichtlinearen Eigenschaften bei fehlenden Änderungen der linearen Eigenschaften, die damit keinen Schlafstadienwechseln entsprachen, sondern Ausdruck kortikaler Aktivierung und Deaktivierung waren. Der Beginn von im ECoG nachweisbaren Schlafstadienwechseln trat erstmals am 112. GT mit dem zyklischen Auftreten von Deltaaktivität auf, welches einem sich entwickelnden NREM-Schlaf-ECoG entsprach. Demgegenüber begann die Entwicklung des REM-Schlaf-ECoG's erst am 130. GT. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass sich die zyklische ECoG-Aktivität mit der Reifung des Hirnstammes entwickelt, welcher die Wechsel zwischen kortikaler Aktivierung und Deaktivierung induziert. Anschließend reifen die thalamischen Schrittmacherzellen, welche das NREM-Schlaf-ECoG induzierenden und erst wesentlich später die kortikalen neuronalen Interaktionen, die im REM-Schlaf aktiv sind.

Eine pränatale Betamethasonbehandlung am 106. GT führte innerhalb von 4 Tagen zu einer vollständigen Reifung des REM-Schlaf-ECoG's. Das REM-Schlaf-ECoG entsprach am 120. GT dem der Kontrollen am 130. GT. Die Reifungsbeschleunigung des REM-Schlafes ging mit einer persistierenden Schlafstadienfragmentierung einher. Eine Wiederholung der Behandlung am 112. und 118. GT führte zu keinen weiteren Effekten, was für eine vollständige Reifung nach dem ersten Behandlungszyklus und / oder eine durch den ersten Behandlungszyklus induzierte Glukokortikoidrezeptorresistenz spricht. In Übereinstimmung damit kam es am 112. GT nicht zu der für eine Glukokortikoidbehandlung typischen akuten vorübergehenden Suppression der ECoG-Aktivität, wenn die Tiere am 106. GT mit Betamethason vorbehandelt waren. Die akute Suppression der ECoG-Aktivität steht in Übereinstimmung mit den akuten Verhaltensänderungen bei menschlichen Feten nach Betamethasonbehandlung. Neben der Fragmentierung der Schlafstadien zerstörte die pränatale Betamethasonbehandlung die zirkadiane Rhythmik der Schlafstadienlänge.

Unser Ergebnis, dass sich der NREM-Schlaf vor dem REM-Schlaf entwickelt, steht damit im Gegensatz zur verbreiteten Ansicht, wonach sich die Schlafstadien aus einer unreifen Form des REM-Schlafes entwickeln. Durch die spätere Reifung des REM-Schlafes werden die Theorien über dessen Bedeutung für die funktionelle Hirnentwicklung verändert. Es konnte damit gezeigt werden, dass die pränatale Betamethasontherapie zur Reifung des cholinergen Systems führt, welches den REM-Schlaf vermittelt. Dies geschieht auf Kosten einer persistierenden Fragmentierung der Schlafstadien als typisches Zeichen einer Depression. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte nach pränatalem Stress bei Ratten die Schlafstadienfragmentierung bis ins Erwachsenenalter nachgewiesen werden. Diese die Hirnfunktion beeinflussenden Effekte machen Untersuchungen am Menschen und bis dahin eine enge Indikationsstellung der pränatalen Glukokortikoidtherapie notwendig.

2 Einleitung

2.1 Funktionelle Hirnentwicklung im letzten Drittel der Schwangerschaft

2.1.1 Entwicklung von fetalen Verhaltensstadien beim menschlichen Baby

Jede Mutter kann im Laufe ihrer Schwangerschaft feststellen, dass der Fetus in utero nicht nur ruhig schläft, sondern dass sich Phasen der Ruhe mit körperlich aktiven Phasen abwechseln. Diese verschiedenen Abschnitte der Ruhe oder Aktivität sind Bestandteil fetaler Verhaltensstadien. Sie entstehen durch organisierte Funktionszustände des Gehirns, erfordern eine hohe integrative Leistung und setzen damit eine hohe Entwicklungsstufe der zerebralen Aktivität voraus (Lydic und Baghdoyan 1999). Der Zeitpunkt der Entwicklung von REM- und NREM-Schlaf ist schwierig zu bestimmen, weil sich die verschiedenen Eigenschaften der Verhaltensstadien in unterschiedlichen Phasen der Entwicklung herausbilden (Okai et al. 1992, Dreyfus-Brisac 1975, Curzi Dascalova et al. 1993, Nijhuis et al. 1982). Folglich sind bestimmte Eigenschaften der Verhaltensstadien schon sehr zeitig vorhanden, aber der Zusammenhang der verschiedenen charakteristischen Merkmale der Stadien, welche letztendlich Schlafstadien kennzeichnen, die ihren Ausdruck in zyklischen Änderungen von EEG-Mustern finden, entwickelt sich erst viel später (Nijhuis et al. 1982). Ab der 28. bis 31. Schwangerschaftswoche (SSW) ist bei menschlichen Feten die Entwicklung umschriebener Verhaltensstadien mit ersten Zeichen periodischer Änderung der Augenbewegung nachweisbar (Okai et al. 1992). Bei Frühgeborenen können die Verhaltensstadien ungefähr ab der 32. postkonzeptionellen Woche anhand zweier Kriterien unterschieden werden: schnelle Augenbewegungen und zyklische EEG-Aktivität (Dreyfus-Brisac 1975, Curzi Dascalova et al. 1993, Selton et al. 2000, Lombroso 2004). Beim Feten gehen Änderungen der Augenbewegungen etwa ab der 32. SSW mit Änderungen der Herzfrequenz und Körperbewegungen einher (Nijhuis et al. 1982, Okai et al. 1992). Die Atemaktivität lässt ab der 30. bis 32. SSW eine deutliche Abhängigkeit von den Verhaltensstadien erkennen. Zuletzt scheinen sich die Körperbewegungen in die Verhaltensstadien einzufügen (Nijhuis et al. 1982). Wenn man alle charakteristischen Kriterien der Stadien zusammen zählt, sind definierte Schlafstadien nicht vor der 36. SSW nachweisbar (Nijhuis et al. 1982, Martin 1981).

Bei reifen menschlichen Feten werden mit Hilfe von Sonographie und Kardiotokographie vier Verhaltensstadien unterschieden (Nijhuis et al. 1982):

- 1F (gleich dem postnatalen NREM-Schlaf) — selten Körperbewegungen, keine Augenbewegungen, geringe Herzfrequenzvariabilität, regelmäßige Atembewegungen, jedoch kleine Akzelerationen;
- 2F (gleich dem postnatalen REM-Schlaf) — zahlreiche Körperbewegungen, konstant vorhandene Augenbewegungen, große Herzfrequenzvariabilität mit häufigen, kleinen bis mäßigen Akzelerationen während der Bewegungen, unregelmäßige Atembewegungen;
- 3F („quite alertness“) — ähnlich wie im Stadium 1F nur gelegentliche Körperbewegungen jedoch vorhandene Augenbewegungen, stabile und mäßige Herzfrequenzvariabilität bei fehlenden Akzelerationen;
- 4F (entspricht wahrscheinlich dem wachen Feten) — heftige, lange andauernde Körperbewegungen, konstante Augenbewegungen, instabile Herzfrequenz mit großen und langen Akzelerationen und tachykarden Abschnitten.

Im EEG von Frühgeborenen konnte schon in der 32. Woche nach Konzeption eine Differenzierung von Schlafstadien nachgewiesen werden (Curzi Dascalova et al. 1993, Selton et al. 2000). Dabei verbringen die Frühgeborenen in diesem Gestationsalter noch mehr als 50% der Zeit in einem unreifen Schlafstadium (Mirmiran et al. 2003b). Wenn man für die Schlafstadien auch alle Verhaltenstadienmerkmale des Erwachsenen berücksichtigt (Globus 1970, Kraemer et al. 1984, Harper et al. 1983), würden nach dieser strengen Definition nur 40% der gesunden Frühgeborenen in der 36. SSW abgrenzbare Schlafstadien zeigen (Borghese et al. 1995). Parallel dazu wurden bei Primatenfeten zum Zeitpunkt 0,8 – 0,9 der Schwangerschaft koordinierte zyklische ECoG-Aktivität, schnelle Augenbewegungen oder Herzfrequenzänderungen nur in 40% der Fälle nachgewiesen (Grieve et al. 1994). Der Grad der Entwicklung der Schlafmuster bei Neugeborenen scheint dabei gut mit der neurologischen Reife des Zentralnervensystems zu korrelieren (Borghese et al. 1995, Gertner et al. 2002, Scher et al. 1994, Whitney und Thoman 1993).

Dabei besteht seit vielen Jahren eine Diskussion über die zeitliche Abfolge der Entwicklung von Schlafstadien. Unser Verständnis der Schlafstadienentwicklung wurde meistens auf qualitative Beschreibungen solcher Eigenschaften der Schlafstadien bei Feten und bei Frühgeborenen begrenzt. Die meisten Autoren nehmen an, dass die Entwicklung der Schlafstadien von einer unreifen Form des REM-Schlafes ausgeht (Übersicht in Mirmiran et al. 2003a, Frank und Heller 2003, Anders et al. 1995, Jouvet-Mounier et al. 1970, Shimizu und Himwich 1968, Parmelee et al. 1967, Roffwarg et al. 1966, Szeto und Hinman 1985), während lediglich eine einzige Arbeit annimmt, dass sich REM- und NREM-Schlaf aus

einem unreifen Schlafstadium entwickelt (Frank und Heller 2003). Diese Studie stammte allerdings von Ratten, deren Gehirn sich postnatal entwickelt, weshalb sich die Ergebnisse schwierig auf den Menschen als perinatalen Hirnentwickler übertragen lassen (Frank und Heller 1997). Der Zeitpunkt der Entwicklung des REM-Schlafes, welcher aufgrund seiner Prominenz zur Geburt (ca. 50% Anteil REM-Schlaf) für die funktionelle Hirnentwicklung wichtig scheint, ist unbekannt.

2.1.2 Entwicklung zyklischer ECoG-Aktivität im Tiermodell

Die Entwicklung der Schlafstadien ist ein Meilenstein in der Reifung der Hirnfunktion. Die zyklische elektrokortikale Hirnaktivität ist die wichtigste Eigenschaft der Schlafstadien. Da beim menschlichen Feten das direkte Monitoring der elektrokortikalen Hirnaktivität nicht möglich ist, fehlt die eindeutige Zuordnung der fetalen Verhaltensstadien zu definierten Mustern im EEG. Mit Hilfe des fetalen Schafes als Tiermodell für die menschliche Fetalperiode sind Studien zur fetalen Hirnfunktion und deren Reifung möglich. Die intrauterine Entwicklung des Schafes ähnelt der des Menschen, auch wenn das Schafsgehirn zum Zeitpunkt der Geburt einen höheren Reifungsgrad als das menschliche Gehirn aufweist (Astrom 1967, Dobbing und Sands 1979). Aufgrund der Möglichkeit zur chronischen Instrumentierung der Schaffeten und der damit verbundenen kontinuierlichen Ableitung der elektrokortikalen Hirnaktivität und der Muskelaktivität vom Feten lassen sich die Verhaltensstadien bestimmten Schlafstadien im EEG zuordnen. Die Schlafstadien können ab dem 115. bis 120. Gestationstag (0,8 der Gestation, Gestationsdauer etwa 146 Tage) durch visuelle EEG-Analyse unterschieden werden (Szeto und Hinman 1985). Dabei wechselt sich ein hochamplitudiges, niedrigfrequentes ECoG-Muster, welches den NREM-Schlaf widerspiegelt, mit einem niedrigamplitudigen, hochfrequenten ECoG-Muster, welches den REM-Schlaf reflektiert, ab. Zwischen diesen beiden Schlafstadien gibt es kurze Übergangsphasen, die als transitorische Stadien oder „indeterminate“ bezeichnet werden (McNerney und Szeto 1990), wobei der reife Schaffetus ca. 80 – 90% der Zeit im REM- oder NREM-Schlaf verbringt. Vergleichbar dazu lassen sich in ECoG-Ableitungen an unanästhesierten Meerschweinchenfeten, deren Gehirne sich hauptsächlich intrauterin entwickeln, nicht vor 0,8 der Schwangerschaft mit Schlafstadien vergleichbare Abschnitte finden (Umans et al. 1985).

Der NREM-Schlaf wird durch den Thalamus, welcher seinerseits unter der Kontrolle des mesenzephalo-retikulären Systems steht, gesteuert. Der REM-Schlaf mit einer hohen kortikalen Aktivität wird von cholinergen Neuronen in der medullären Formatio reticularis und dem dorsalen pontinen Tegmentum generiert und durch pontine Strukturen vermittelt. Schlafstadienwechsel werden durch eine Suppression von verschiedenen langsamen thalamokortikalen Rhythmen im Hirnstamm generiert (Überblick in McCormick und Bal 1997).

Die Schlafstadienlänge wird durch einen ultradianen Oszillator in der mesopontinen Verzweigung gesteuert und durch zirkadiane Oszillatoren im Nucleus suprachiasmaticus kontrolliert (Pace-Schott und Hobson 2002). Somit wird der NREM- oder REM-Schlaf abhängig von den aktiven Neuronen im ventrolateralen präoptischen Kern gesteuert (Lu et al. 2000).

Über ein Vorkommen von Verhaltensstadienmerkmalen wie schnellen Augenbewegungen im EEG vor der EEG-Differenzierung wird in Studien an fetalen Affen (Stark et al. 1991, Stark et al. 1993, Grieve et al. 1994) und in Studien an fetalen Schafen (Clewlow et al. 1983, Dawes et al. 1980, Szeto und Hinman 1985) und Meerschweinchen (Astic et al. 1973, Umans et al. 1985) nichts berichtet. Dies ist theoretisch möglich, da einerseits die Verhaltensstadien induzierende mesenzephalo-retikuläre-Aktivität Augen- und Körperbewegungen, Atmung, Herzfrequenz und Muskeltonus durch die Beeinflussung von Hirnstammkernen kontrolliert und andererseits die spezifischen EEG-Muster über aufsteigende Bahnen zum Thalamus und Kortex beeinflusst werden (Übersicht in McCormick und Bal 1997, Steriade 2003, Steriade 2004, Bazhenov et al. 2002).

2.2 Pränatale Glukokortikoidtherapie

2.2.1 Klinische Bedeutung einer pränatalen Glukokortikoidtherapie

Die pränatale Glukokortikoidtherapie wird klinisch zur Beschleunigung der fetalen Lungenreifung bei Babys, welche von einer Frühgeburt bedroht sind, eingesetzt und senkt ab der 29. Schwangerschaftswoche (SSW) die Inzidenz des Respiratory Distress Syndroms (RDS) (Übersichten in Ballard und Ballard 1995, Crowley 1995). Darüber hinaus verfügen Glukokortikoide über einen protektiven Effekt gegenüber perinatalen intraventrikulären Blutungen (Elimian et al. 1999, Leviton et al. 1993). Aufgrund einer 1994 vom US-

amerikanischen National Institutes of Health (NIH) (NIH 1995) veröffentlichten Therapieempfehlung zur Routinemedikation von schwangeren Frauen mit Glukokortikoiden bei drohender Frühgeburt vor der 32. SSW, stieg der Anteil der Mütter, die in den USA mit Glukokortikoiden behandelt wurden von 52% 1995 auf 75% 2000 mit steigender Tendenz (Meadow et al. 2003). Da eine größere Anzahl von Frauen Glukokortikoide unter der Annahme einer Frühgeburt erhielten, kann die Zahl der Schwangeren, welche mindestens einmal während einer Schwangerschaft Glukokortikoide erhielten größer sein als die Rate der Frühgeburten (Polyakov et al. 2007).

Neben diesen positiven pulmonalen Eigenschaften von Glukokortikoiden besitzen diese andererseits eine Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen auf das Kreislauf- und Zentralnervensystem. Schon die einmalige pränatale Gabe von Glukokortikoiden bei Menschen (Piazzè et al. 2005, French et al. 1999, Murphy et al. 2001), Primaten (Johnson et al. 1981, Uno et al. 1994) bzw. Schafen (Jobe et al. 1998, Gatford et al. 2008) führte zu Wachstumsretardierungen einschließlich des Hirnwachstums (Whitelaw und Thoresen 2000, Moss et al. 2005, Aghajafari et al. 2002). Eine unmittelbare arterielle Blutdrucksteigerung konnte sowohl beim unreifen (Tangalakakis et al. 1992) und reifen (Derks et al. 1997) fetalen Schaf in utero und unter der Geburt (Berry et al. 1997, Padbury et al. 1995, Stein et al. 1993) als auch bei frühgeborenen Babys (Demarini et al. 1999) nachgewiesen werden. Die mütterliche Betamethason- oder Dexamethasongabe führte bei menschlichen Feten zu akuten Verhaltensänderungen, wie der Abnahme von Körperbewegungen, der Atemaktivität und der Herzfrequenzvariabilität (Derks et al. 1995, Mulder et al. 1994, Senat et al. 1998). Selbst der natürliche mütterliche Anstieg der Kortisolausschüttung unter Stress führte abhängig vom Gestationsalter zu lang anhaltenden zerebralen, neuroendokrinen und Verhaltenseffekten (Weinstock 1997, Buitelaar et al. 2003, O'Connor et al. 2002, Huizink et al. 2004, Übersicht in Van den Bergh et al. 2005 und Mulder et al. 2002). Diese unerwünschten zerebralen Nebenwirkungen führten zu Warnungen vor einer unkritischen Anwendung der pränatalen Glukokortikoidtherapie unter Geburtshelfern und Perinatologen (NIH 2000) und sollen nun im Einzelnen kurz erläutert werden.

2.2.2 Zerebrale Effekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie

2.2.2.1 Effekte und Mechanismen einer Glukokortikoidgabe auf die Hirnfunktion beim Adulten

Obwohl Kortisol für eine normale Reifung des zentralen Nervensystems essentiell ist, haben sich zerebrale Nebenwirkungen gezeigt (De Kloet et al. 1988). In zahlreichen Untersuchungen wurden im adulten Tiermodell und beim Menschen Effekte von Glukokortikoiden auf Kognition, Vigilanz, Gedächtnis und Emotionen belegt, wobei der Einfluss von Glukokortikoiden auf das limbische System als Ursache angesehen wird (Übersicht in Lupien und McEwen 1997, Lupien et al. 2007, Mirescu und Gould 2006, Kapoor et al. 2006). Selbst schon die tageszeitliche Schwankung der Kortisolausschüttung führt zu Änderungen der Betaaktivität im EEG als Ausdruck von zentralnervösen Vigilanzschwankungen (Chapotot et al. 1998). Glukokortikoide führen zu einem Anstieg des NREM-Schlafes und inhibieren den REM-Schlaf-Anteil (Steiger 2002).

In vitro Untersuchungen am Hippokampus lieferten die meisten Kenntnisse über die zugrunde liegenden elektrophysiologischen Mechanismen. Durch die Beeinflussung verschiedener Transmittersysteme, die Änderung der K^+ -Leitfähigkeit der Zellmembran (Übersichten in Joels und de Kloet 1992, Joels und de Kloet 1994) und über eine Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen (Kerr et al. 1992) wird die neuronale Erregbarkeit hauptsächlich beeinflusst. Effektoren sind neben schnell wirksamen Membranrezeptoren (Duval et al. 1983, Schumacher 1990) intrazelluläre Glukokortikoidrezeptoren (Karst et al. 1993), die durch eine Aktivierung oder Repression von Genen die Genexpression beeinflussen (Evans 1988). Die Glukokortikoideffekte, welche über intrazelluläre Glukokortikoidrezeptoren ihre Wirkung vermitteln, sind stark vom Rezeptortyp abhängig (Übersichten in Joels und de Kloet 1992, Joels und de Kloet 1994). Es existieren zwei unterschiedliche Subtypen von Glukokortikoidrezeptoren: Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, wobei der Typ-II-Rezeptor ubiquitär im gesamten Gehirn vorhanden ist (Ahima und Harlan 1990, Cintra et al. 1994), während der Typ-I-Rezeptor nur im Hippokampus vorkommt (Ahima et al. 1991). Während eine Erregung von Typ-I-Glukokortikoidrezeptoren, die primär im Hippokampus vorkommen, zu einer Steigerung der synaptischen Übertragung führen, bewirkt die Aktivierung von Typ-II-Glukokortikoidrezeptoren, die im gesamten Gehirn vorhanden sind, neben den neurotoxischen und Apoptose induzierenden Effekten eine Abnahme der neuronalen Erregbarkeit (Ahima und Harlan 1990, Joels und de Kloet 1994, Pavlides et al. 1995). Die auch in meiner Arbeit untersuchten und in der Geburtshilfe

am häufigsten verwandten synthetischen Glukokortikoide wie Betamethason, wirken fast ausschließlich auf eben diese Typ-II-Glukokortikoidrezeptoren (Joels und de Kloet 1992, Joels und de Kloet 1994). Die Effekte einer Behandlung mit Betamethason sind durch Typ-II-Glukokortikoidrezeptoren vermittelt.

Neben der Abnahme der neuronalen Erregbarkeit wirken Glukokortikoide auch im ZNS katabol; so vermindern Glukokortikoide die lokale zerebrale Glukoseutilisation im adulten (Doyle et al. 1994) und neonatalen Rattengehirn (Tuor et al. 1997). Im fetalen Schafsgehirn hemmt die pränatale Betamethasonbehandlung in der klinisch verwendeten Dosis selektiv die Komplexe I und IV der Atmungskette, deren Aktivität für die Energiegewinnung limitierend ist (Schwab et al. 2009). Zusätzlich vermittelt die Überaktivierung von Typ-II-Rezeptoren neurotoxische und Apoptose induzierende Effekte (Hassan et al. 1996, Packan und Sapolsky 1990). Über Typ-I-Rezeptoren scheint Kortisol dagegen eine koordinierende Kontrolle über die neuronale Erregbarkeit auszuüben, sowie neuroprotektive Effekte beim adulten Rattengehirn zu haben (Hassan et al. 1996). Da die Sättigungsgrenze von Typ-I-Rezeptoren viel niedriger als die von Typ-II-Rezeptoren ist, führen niedrige Kortisolspiegel im Bereich der Sättigung der Typ-I-Rezeptoren zu einem neuroprotektiven Effekt und hohe Kortisolspiegel über eine verstärkte Aktivierung von Typ-II-Rezeptoren zu einem neurotoxischen Effekt (Hassan et al. 1996).

2.2.2.2 Akute zerebrale Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung

Zunehmend gibt es Hinweise auf akute zerebrale Nebenwirkungen auf die Hirnstruktur und –funktion durch pränatal verabreichte Glukokortikoide. Die akuten Effekte scheinen im wesentlichen ebenfalls durch Änderungen der neuronalen Erregbarkeit, neurotoxische Effekte und katabole Stoffwechseleffekte hervorgerufen zu sein (siehe 2.2.2.1), obwohl es abgesehen von den neurotoxischen Effekten kaum Untersuchungen zu den Mechanismen der zerebralen Nebenwirkungen einer Glukokortikoidtherapie am sich entwickelnden Gehirn gibt.

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zu den Effekten einer pränatalen Betamethasonbehandlung zeigten, dass sich unter dem Einfluss von Betamethason die Latenzzeiten der kortikalen akustisch evozierten Reaktion beim menschlichen Feten

verzögern (Schleussner et al. 2004). Im menschlichen Feten führen pränatale Glukokortikoide wie Betamethason und Dexamethason zu Änderungen von Verhaltenszuständen, was Änderungen der Hirnstammtätigkeit andeutet (Mulder et al. 1997, Senat et al. 1998, Mulder et al. 2004). Ausdruck der Störung der Hirnstammfunktionen sind eine Abnahme der fetalen Aktivität (Mulder et al. 1997), eine Suppression der Atem- und kindlichen Bewegungen (Derks et al. 1995) sowie eine Abnahme der fetalen Herzfrequenz (Derks et al. 1995, Ville et al. 1995, Mulder et al. 1997, Multon et al. 1997, Frusca et al. 2001). Andere Autoren beschrieben auch Akzelerationen der fetalen Herzfrequenz nach Betamethasonbehandlung (Senat et al. 1998). Hierfür ist wahrscheinlich die Dynamik der Herzfrequenzänderung nach Betamethasongabe mit initialer Senkung der Herzfrequenz und konsekutiver Steigerung der Herzfrequenz verantwortlich (Frasch et al. 2007).

Experimentelle Studien an fetalen Schafen, das Modell an dem eine pränatale Glukokortikoidtherapie entwickelt worden ist, haben gezeigt, dass diese Änderungen von akuten Modifikationen der elektrokortikalen Hirnfunktion begleitet werden. So kam es zu einer Abnahme der Komplexität der registrierten kortikalen EEG-Aktivität innerhalb der ersten 24 h nach Betamethasongabe (Schwab et al. 2001a).

Hierfür ist wahrscheinlich neben direkten Membraneffekten auch die Hemmung der Energiebereitstellung in der Atmungskette verantwortlich (Schwab et al. 2009). Diese Änderung der Hirnfunktion könnte dabei auch Ausdruck der veränderten und verzögerten Reaktionen des fetalen Gehirns unter Betamethason als Ausdruck der oben genannten Störung der Transmittersysteme (siehe 2.2.2.1) oder einer Modulierung der synaptischen Reizübertragung sein. In diesem Zusammenhang wurde an adulten Ratten- sowie fetalen Primatenhirnen nach Glukokortikoidgabe eine Dendritendegeneration im Hippokampus festgestellt (Sapolsky et al. 1990, Uno et al. 1990, Uno et al. 1994). Die Dendritendegeneration ging mit einem Verlust an Mikrotubulus assoziierten Proteinen (MAP) einher (Bywood und Johnson 2000). Folgerichtig wies die eigene Arbeitsgruppe bei immunhistologischen Untersuchungen an fetalen Affenhirnen nach maternalen Betamethasonapplikation eine Abnahme der MAP1B und MAP2, sowie eine Abnahme von Synaptophysin nach (Antonow-Schlorke et al. 2001, Antonow-Schlorke et al. 2003, Schwab et al. 2001b, Schwab et al. 1998). MAPs sind in die zerebrale Morpho- und Synaptogenese involviert und wesentlich für die spätere Aufrechterhaltung der neuronalen Morphologie und Ernährung der neuronalen Fortsätze (Übersicht in Tucker 1990). Synaptophysin kommt in 95% aller Synapsen vor und gilt als Markerprotein für die Morphogenese und Funktion des

Gehirns (Antonow-Schlorke et al. 2003). Eine Abnahme der MAP's gilt als Hinweis für eine frühe intrazelluläre, strukturelle Störung infolge verschiedenster neuronaler Schädigungen (Bywood und Johnson 2000, Schwab et al. 1998).

2.2.2.3 Chronische zerebrale Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung

Eine der bisher durchgeführten Follow-up Studien von Kindern, deren Mütter zur Förderung der Lungenreifung bei einer drohenden Frühgeburt einmalig mit Dexamethason oder Betamethason behandelt wurden, konnte in Übereinstimmung mit den experimentellen Untersuchungen subtile kognitive Störungen im Alter von 6 Jahren nachweisen (MacArthur et al. 1982). Auch die mehrmalige Betamethasonbehandlung zur Förderung der Lungenreifung führte zu Verhaltensauffälligkeiten im Alter von 3 – 6 Jahren (French et al. 2004) und die postnatale Behandlung über 3 Wochen zu kognitiven und psychomotorischen Störungen im Schulalter (Yeh et al. 2004). Allerdings zeigten andere Follow-up Studien bis zum Alter von 32 Jahren keine Wachstums-, Verhaltens-, kognitive- oder psychische Auffälligkeiten (Dalziel et al. 2005, Dessens et al. 2000, Schmand et al. 1990). Auch die frühe Gabe von Dexamethason während der Schwangerschaft zur Therapie der kongenitalen Nebennierenhyperplasie bewirkte keine Störung der motorischen oder kognitiven Entwicklung bis zum Alter von 12 Jahren (Meyer-Bahlburg et al. 2004).

Obwohl der Grad der Entwicklung der Schlafmuster bei Neugeborenen während der ersten Lebensmonate gut mit der Reife des Zentralnervensystems korreliert (Scher 1997, Stores 2001, Borghese et al. 1995, Gertner et al. 2002, Scher et al. 1994, Whitney und Thoman 1993), wurde in Risikoschwangerschaften, die mit fetalem Stress einhergehen, eine Beschleunigung der Entwicklung der Rhythmizität fetaler Verhaltenszustände beschrieben (Amiel-Tison et al. 2004, Borghese et al. 1995).

In den letzten Jahren konnten in mehreren retrospektiven epidemiologischen und experimentellen Untersuchungen übereinstimmende Effekte von physischen, psychischen oder sozialen Stress während der Schwangerschaft (bei den Nachkommen verschiedener Spezies von Ratten bis nichtmenschlichen Primaten) bis in das Erwachsenenalter in Form von motorischen und kognitiven Entwicklungsstörungen und abnormem Verhalten, aber auch einer erhöhten Inzidenz an Depressionen und Schizophrenien nachgewiesen werden

(Huizink et al. 2004, Sloboda et al. 2005, Weinstock 2001, Welberg und Seckl 2001). In prospektiven klinischen Studien, deren längste Jugendliche bis zum Alter von 15 Jahren untersucht hat, konnten ebenfalls negative Effekte von Stress während der Schwangerschaft auf die motorische und kognitive Entwicklung und eine Assoziation zu Verhaltensauffälligkeiten und zum Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (Van den Bergh et al. 2005) gezeigt werden. Effekte von Stress zeigten sich dabei schon intrauterin. So war das Verhalten von Feten gestresster Mütter gestört, und es traten Wachstumsverzögerungen auf (Sloboda et al. 2005, Van den Bergh et al. 2005).

Aber nicht nur chronischer Stress, sondern bereits einmalige Stressereignisse wie Naturkatastrophen oder der 11. September 2001 führten bei Kinder von Frauen, welche in diesem Zeitraum schwanger waren, zu postnatalen Verhaltensstörungen (Brand et al. 2006, Huizink et al. 2004, Sloboda et al. 2005).

Stress spiegelt sich dabei unter anderem in erhöhten Glukokortikoidspiegeln wider. Für die Besetzung der Typ-II-Rezeptoren sind dabei schon physiologisch hohe Kortisolspiegel, wie sie bei Stress erreicht werden, ausreichend (Scully und Otten 1995). Die Änderung der Trajektorie der Hirnentwicklung führt vermutlich zu subtilen und anhaltenden Störungen der neuronalen Funktion. So beeinflusst pränataler Stress sich aktiv teilende Zellen und verursacht ein tief greifendes Defizit in der interneuronalen Konnektivität bei Ratten (Ulupinar et al. 2006). Stress bedingte Änderungen der Hirnentwicklung beziehen besonders den zerebralen Kortex und subkortikale Kernstrukturen mit ein (Van Wassenaeer 2005, Inder et al. 2005). Interessanterweise zeigten die Kinder pränatal gestresster Mütter (auch die nichtmenschlicher Primaten) mehr psychomotorische Auffälligkeiten, wenn der Stress in der Frühschwangerschaft, noch vor der Reifung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse erfolgte, wahrscheinlich weil dann die Neuroneogenese und die Migration der Nervenzellen am stärksten beeinflusst wird (Van den Bergh et al. 2005).

In Untersuchungen bei adulten Ratten, die pränatal Glukokortikoide bekommen hatten, zeigte sich eine Induktion von Verhaltens- und Lerndefiziten, sowie eine gestörte motorische Koordination und Stressverarbeitung (Welberg et al. 2001). Nach einer perinatalen Glukokortikoidgabe wurden bei der Ratte und der Maus ebenfalls Verhaltens- und Lerndefizite beobachtet (Benesova und Pavlik 1989, DeKosky et al. 1982, Howard 1973, Vicedomini et al. 1986), die mit einer gestörten hippocampalen Elektrophysiologie einhergingen (Pavlidis et al. 1995, Vicedomini et al. 1985).

Erhöhte Glukokortikoidspiegel in diesem Alter führen zu einer Desensibilisierung der hippokampalen Glukokortikoidrezeptoren, die in die negative Rückkopplung der HPA-Achse einbezogen sind, und damit zu einer dauerhaften Änderung der Sensitivität der Stressachse (Meaney und Szyf 2005, Speirs et al. 2004, Lesage et al. 2002, Matthews 2002, Welberg et al. 2001).

2.2.2.4 Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die strukturelle Hirnentwicklung

Eine schädliche Wirkung pränatal erhöhter Glukokortikoidspiegel auf die strukturelle Entwicklung des Zentralnervensystems ist ebenfalls an vielen Tiermodellen einschließlich nichtmenschlicher Primaten beschrieben worden (Coe et al. 2003, Welberg und Seckl 2001, Matthews 2000, Whitelaw und Thoresen 2000, Uno et al. 1994, Huang et al. 2001, Quinlivan et al. 2001).

Bei Primaten konnte gezeigt werden, dass eine einmalige pränatale Glukokortikoidgabe zu einer Verminderung der Neuronenzahl im Hippokampus führt (Uno et al. 1994). Im sich entwickelnden Gehirn wurde weiterhin eine glukokortikoidbedingte Hemmung der Neuro- und Gliagenese (Übersicht in De Kloet et al. 1988) sowie der Myelinisierung (De Kloet et al. 1988, Gumbinas et al. 1973, Howard und Benjamins 1975, Newnham 2001, Huang et al. 2001) beobachtet. Dabei ist die Hemmung der Myelinisierung möglicherweise durch die Hemmung der Gliagenese bedingt (Howard und Benjamins 1975). Als Ausdruck der Störung der Morphogenese und der Hirnentwicklung wurde bei Schaffeten eine Reduktion des Geburtsgewichts um bis zu 27% nach drei oder viermaliger pränataler Betamethasonbehandlung (0,5 mg/kgKG) festgestellt (Ikegami et al. 1997). Von dieser Reduktion des Geburtsgewichts sind alle Organe einschließlich des Gehirns betroffen (Newnham et al. 1999). Nach einer pränatalen Glukokortikoidgabe beim Menschen wurde eine Reduktion des Geburtsgewichts und des Kopfumfangs festgestellt (French et al. 1999, Thorp et al. 2002). Ein um bis zu 20% verringertes Gewicht des fetalen Gehirns nach der Geburt trat bei Schafen auf, die dreimal in wöchentlichen Abständen eine Injektion Betamethason (0,5 mg/kgKG) erhielten (Huang et al. 1999). Moss et al. konnten ein gegenüber unbehandelten Schafen vermindertes Hirngewicht um 13 – 18% auch noch nach 3,5 Lebensjahren nachweisen (Moss et al. 2005). Eine Verminderung des intrauterinen Wachstums wurde bei wiederholter Glukokortikoidgabe auch beim menschlichen Feten

beobachtet (Adamson und Kingdom 1999, Modi et al. 2001, Murphy et al. 2001, French et al. 1999). Ursache ist möglicherweise eine Hemmung der Proliferation zugunsten einer Differenzierung wie sie auch bei der Glukokortikoidgabe zur Förderung der Lungenreifung beobachtet wird (Jobe 2001, Grier und Halliday 2004, Aghajafari et al. 2002, French et al. 1999, Moss et al. 2005).

3 Ziele der Arbeit

Das Ziel der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit war erstens den noch hochgradig umstrittenen zeitlichen Verlauf der Entwicklung der pränatalen Schlafstadien aufzuklären und zweitens den Einfluss von Glukokortikoiden auf diese Entwicklung nachzuweisen.

Untersuchung zur Entwicklung der Schlafstadien

Wie oben erläutert, sind die Entstehung der Schlafstadien und der zeitliche Verlauf der Entwicklung unklar. Es besteht Unklarheit darüber, inwiefern unreifer Schlaf REM-Schlaf darstellt. Es ist nicht bekannt wie die Reifung der REM- und NREM-Schlaf generierenden Strukturen zu einer zyklischen elektrokortikalen Hirnaktivität und im Endeffekt zu bestimmten Schlafstadien führt. Der Verlauf der Entwicklung der zyklischen elektrokortikalen Hirnaktivität kann uns Einblicke in die Reifung der subkortikalen und kortikalen Hirnfunktion geben und uns zeigen, wie diese Reifung zur Herausbildung der organisierten Schlafstadien führt. Da die Entwicklung der zyklischen elektrokortikalen Hirntätigkeit ein gut abgrenzbarer Marker der fetalen Hirnentwicklung ist und die Generierung der Schlafstadien verschiedene Hirnregionen und Funktionssysteme einbezieht, reflektiert die Entwicklung der Schlafstadien die Reifung der in die kortikale Aktivierung und Deaktivierung involvierten Hirnstrukturen (Halpern et al. 1995).

Das Verständnis der Entwicklung der zyklischen elektrokortikalen Hirnaktivität ist von erheblicher medizinischer Bedeutung für das Verständnis der funktionellen Hirnentwicklung (z.B. Bedeutung der unspezifischen kortikalen Stimulation durch die erhöhte neuronale Aktivität im REM-Schlaf) und erlaubt einen Einblick in die neurologische Steuerung der Schlafregulation (Halpern et al. 1995). Die Schlafstadienwechsel werden dabei im Hirnstamm generiert, der NREM-Schlaf wird durch den Thalamus gesteuert und der REM-Schlaf mit einer hohen kortikalen Aktivität wird in der medullären Formatio reticularis generiert (Überblick in McCormick und Bal 1997). Durch die Untersuchung der Entwicklung zyklischer elektrokortikaler Hirnfunktionen können Einblicke in die Schlafpathologien Neugeborener wie den plötzlichen Kindstod gewonnen werden. Außerdem ist keine Theorie der (noch intensiv diskutierten) Funktion des Schlafes (Siegel 2005, Rechtschaffen 1998, Kryger 2005) ohne Berücksichtigung der drastischen Änderungen der Gehirnfunktion während der Entwicklung der zyklischen elektrokortikalen Tätigkeit komplett.

Die Entwicklung der Schlafstadien und der hierzu assoziierten zyklischen elektrokortikalen Hirnaktivität findet intrauterin statt. Menschliche intrauterine EEG-Ableitungen sind nicht möglich, und Ableitungen bei Frühgeborenen werden für diese Fragestellung als unzuverlässig eingeschätzt (Scher 1997), da sie nicht über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden können und im Vergleich zur intrauterinen Umgebung ganz andere Einflüsse auf das Baby bestehen. Um die Entwicklung der funktionellen Hirnorganisation beurteilen zu können, leiteten wir das ECoG bei fetalen Schafen in utero während der Entwicklung der zyklischen ECoG-Aktivität zwischen 0,7 und 0,9 der Schwangerschaft, vergleichbar der 27. bis 35. SSW bei menschlichen Feten, ab. Die Analyse dieser langen Entwicklungsperiode erlaubte uns, die Entwicklung der zyklischen ECoG-Aktivität zu monitorieren. In bisherigen quantitativen Analysen wurde nur der unmittelbare Zeitraum der Entwicklung der zyklischen ECoG-Aktivität durch visuelle- oder Spektralanalyse untersucht, ohne das unreife Schlafstadium näher zu charakterisieren oder die zeitliche Abfolge der Entwicklung der Schlafstadien zu berücksichtigen (Szeto und Hinman 1985, Szeto et al. 1985, Ruckebusch 1972, Clewlow et al. 1983). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der fetalen Verhaltensstadien bei Schaffeten eng mit der Entwicklung der zyklischen ECoG-Aktivität assoziiert ist. Die Entwicklung der fetalen Verhaltensstadien beim Schaf ähnelt im zeitlichen Ablauf der des menschlichen Feten (Szeto und Hinman 1985).

Das ECoG ist ein hochkomplexes Signal das Informationen enthält, die nicht mit linearen Methoden beschrieben werden können (Micheloyannis et al. 1998b, Palus 1996, Pritchard et al. 1995, Theiler und Rapp 1996). Sensitive Analysemethoden sind essentiell, wenn man die Eigenschaften der ECoG-Aktivität im unreifen Schlaf und die zeitliche Abfolge der Entwicklung der zyklischen ECoG-Aktivität analysieren will. Die von uns genutzten nichtlinearen ECoG-Analyseverfahren können Aussagen über die Komplexität des ECoG's treffen und sind sensitiver bei der Detektion von Phasen kortikaler Aktivierung und Deaktivierung (Schwab et al. 2000a). Zur Analyse dieser nichtlinearen Eigenschaften des fetalen ECoG's wurde ein Algorithmus zur Schätzung eines so genannten Punktvorhersagefehlers, der auf dem Wolf-Algorithmus für die Schätzung des führenden Lyapunov Exponenten basiert, benutzt. Dabei wird die lokale exponentielle Divergenz benachbarter Trajektorien im Phasenraum geschätzt (Schwab et al. 2000a). Sie ist ein Maß für die theoretische Vorhersagbarkeit der untersuchten Zeitreihe und spiegelt die Kausalität und damit die Komplexität der untersuchten Zeitreihe wider (Schwab et al. 2000a). Ein höherer Vorhersagefehler wird von einer niedrigeren Vorhersagbarkeit oder von einer Kausalität von Zeitreihen und andersherum begleitet.

Untersuchungen zu den Effekten einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung

In einem zweiten Teil der Untersuchungen sollte der Einfluss einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung mit der klinisch zur Lungenreifung verwendeten Dosis an Betamethason auf die Entwicklung der zyklischen elektrokortikalen Hirnaktivität und damit auf die funktionelle Hirnentwicklung untersucht werden. Wir nahmen an, dass die pränatale Glukokortikoidtherapie das Wachstum zugunsten der Differenzierung, wie es in der Lunge gezeigt worden ist, hemmt (Jobe 2001, Grier und Halliday 2004). Die Beschleunigung der neuronalen Differenzierung sollte die Entwicklung der fetalen Hirnfunktion vorantreiben. Neben den chronischen Effekten auf die Hirnentwicklung und die Hirnfunktion im späteren Leben (siehe 2.2.2.3) haben pränatal verabreichte Glukokortikoide akute Effekte auf die fetale Hirnfunktion, wie sie experimentell und auch beim menschlichen Feten mittels fetaler Magnetencephalographie nachgewiesen worden sind (siehe 2.2.2.2).

Das Schaf ist für diese Untersuchungen besonders geeignet, da an diesem Modell die pränatale Glukokortikoidbehandlung zur Förderung der Lungenreifung entwickelt worden ist (Liggins 1969). In dem Gestationsalter, indem sich beim fetalen Schaf die Entwicklung der elektrokortikalen Hirnfunktion vollzieht (Szeto und Hinman 1985, Szeto et al. 1985), werden Glukokortikoide klinisch eingesetzt (NIH 1995) (27. bis 34. SSW, entsprechend 0,7 – 0,9 der Gestation beim Schaffeten). In diesem Alter reift außerdem die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) (Challis und Brooks 1989). Wie in Kapitel 2.2.2.3 dargelegt, führen erhöhte Glukokortikoidspiegel in diesem Alter zu einer Desensibilisierung der hippokampalen Glukokortikoidrezeptoren, die in die negative Rückkopplung der HPA-Achse mit einbezogen sind, und damit zu einer dauerhaften Änderung der Sensitivität der Stressachse führen (Meaney und Szyf 2005, Speirs et al. 2004, Lesage et al. 2002, Matthews 2002, Welberg et al. 2001). Die Desensitivierung der Glukokortikoidrezeptoren führt möglicherweise zu einer Resistenz gegenüber wiederholten Gaben von Glukokortikoiden wie sie vor den revidierten NIH Empfehlungen von 2000 erfolgten (NIH 2000).

Deshalb sollten neben den akuten und chronischen Effekten von Glukokortikoiden auf die Entwicklung der zyklischen elektrokortikalen Hirnaktivität auch die Effekte einer wiederholten Glukokortikoidgabe untersucht werden.

4 Material und Methode

4.1 Chirurgische Instrumentierung der Feten

Die Versuche wurden an Schafen der Rasse Ramboillet-Colombia bzw. deren europäischer Entsprechung Merino-Schwarzkopf mit bekanntem Gestationsalter im Dept. of Biomedical Sciences, Laboratory for Pregnancy and Newborn Research, Cornell University, Ithaca, New York, USA und am Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland durchgeführt. Die Tierschutzkommission des Landes Thüringen und das „Cornell University Animal Use and Care Committee“ genehmigten die Untersuchungen. Aufgrund der aufwendigen Instrumentierung waren zu ihrer Durchführung 3 sterile und 1 unsteriler Mitarbeiter notwendig. Zur Realisierung der Experimente wurden 2 Mitarbeiter benötigt. Mir persönlich oblag die ECoG-Analyse aller Tiere, zusätzlich beteiligte ich mich an den in Deutschland durchgeführten Instrumentierungen und Ableitungen.

Die Tiere standen mindestens 5 Tage vor der chirurgischen Instrumentierung zur Akklimatisierung bei Futter ad libitum und festem Hell-Dunkel-Rhythmus (14h Licht, Dunkelheit von 21 Uhr bis 7 Uhr) in den Laborräumen ein. Nach 24h Nahrungskarenz und Prämedikation mit 1 g Ketamin (Ketaflo, Abbott, USA bzw. Ketamin 10, Atarost, Deutschland) i.m. und 0,8 mg Glykopyrrolat (Glykopyrrolat, American Regent., USA bzw. Robinul, Brenner-Efeka, Deutschland) i.m. erfolgte am 100 ± 1 Gestationstag (0,65 der Gestation bei einer Gestationsdauer von 146 Tage) die chirurgische Instrumentierung unter Inhalationsnarkose mit 1,5% Isofluran (Isoflo, Abbott, Deutschland) in 100% Sauerstoff.

Dem Muttertier wurden die linke A. carotis communis zur Blutprobengewinnung und die linke V. jugularis externa zur postexperimentellen Antibiotikaphylaxe und Schmerztherapie unter Verwendung von Polyvinyl-Katheter, (Tygon, Norton Performance Plastic, USA bzw. RüscheLit, Rüsche, Deutschland) katheterisiert.

Die Entwicklung des Feten erfolgte durch einen abdominalen Median- und anschließenden Uterusschnitt. Dem Fetus wurde ein Katheter über die linke A. carotis communis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Er diente der arteriellen Blutdruckmessung und Blutprobenentnahme zur Blutgasanalyse. Weitere Katheter platzierten wir über die linke V. jugularis externa in der V. cava anterior, diese entspricht der humanen V. cava superior, zusätzlich über die V. saphena magna in die V. cava posterior zur Mikrosphärenapplikation im Rahmen einer weiteren Studie (Ergebnisse nicht gezeigt) und in die Amnionhöhle des

Muttertieres zur Aufzeichnung des hydrostatischen Druckes zur Korrektur der fetalen arteriellen Blutdruckmessung (Abb. 1). Die Ergebnisse dieser Messungen sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Zur fetalen ECoG-Ableitung wurden nach Freilegung der Kalotte je eine Messingschraubenelektrode links und rechts biparietal und bifrontal in das Os frontale und Os parietale in jeder Richtung ca. 10 mm vom Bregma entfernt in die Schädelknochen implantiert und mit einem Kaltpolymerisat (Kallocryl, Laborchemie, Apolda, Deutschland) eingegossen. Das garantierte einen festen Sitz und eine gute elektrische Isolation der Elektroden. Edelstahldrahtelektroden (Cooner Wire, Cathsworth, USA bzw. LIFY, Metrofunk Kabel-Union, Deutschland) wurden zur Aufzeichnung des Elektrokardiogramms (EKG) in die Muskulatur beider Schultern und in den Knorpel des Sternums sowie dem Muttertier zur Aufzeichnung der Uterus-Kontraktionen in die Uterusmuskulatur eingenäht. Sämtliche Elektroden und fetale Katheter wurden durch eine Inzision in der Flanke des Mutterschafes nach außen geleitet und der Uterus und das mütterliche Abdomen wieder verschlossen.

Als Antibiotikaphylaxe erhielt das Muttertier präoperativ 1 g Ampicillin (AMP-Equine, SmithKline Beecham, USA bzw. Ampicillin, Ratiopharm, Deutschland) i.m.. Postoperativ wurde die Antibiotikaphylaxe über 3 Tage zweimal täglich mit jeweils 0,5 g Ampicillin i.v. und zusätzlich in die Amnionhöhle weitergeführt. Die Schmerztherapie erfolgte mit 2x1 g Phenylbutazon (Equiphene paste, Luitpold Pharmaceuticals, USA) oral bzw. 2x150 mg Phenylbutazon (Phenylbutazon cp-pharma, Deutschland) i.m. über 2 Tage und am Operationstag 2x2000 mg Metamizol (Arthropur, Atarost, Deutschland) i.v.. Unmittelbar postoperativ schlossen wir alle Katheter an Infusionspumpen an und perfundierten sie kontinuierlich mit Heparin 12,5 IU / ml in 0,9%iger NaCl- Lsg. (Infusionsrate 0,5 ml / h).

Elektroden:

EMG (Uterus)
EKG
ECoG

Katheter

V. jugularis externa
A. axillaris
V. saphena magna
Amnionhöhle

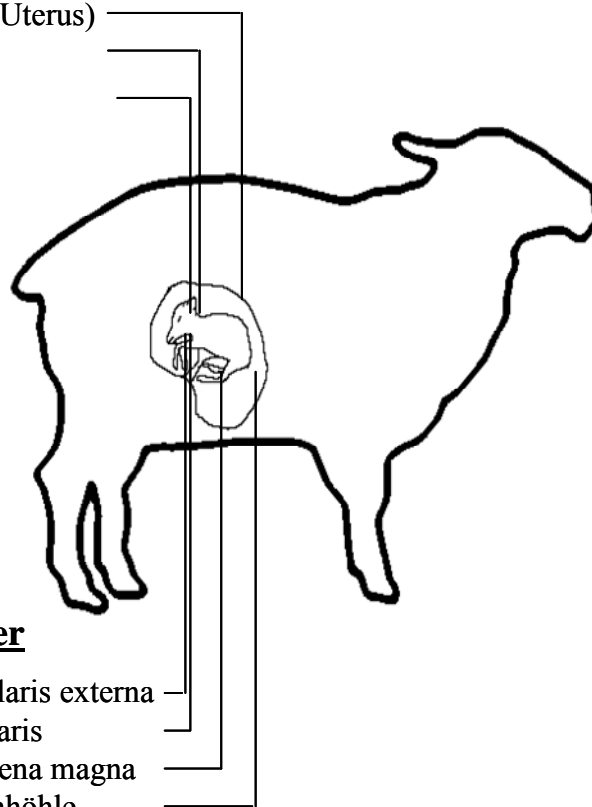


Abb. 1 Schema des instrumentierten Schaffeten

4.2 Versuchsablauf und Tiergruppen

Nach der Instrumentierung am 100 ± 1 Gestationstag (0,65 der Gestation bei einer Gestationsdauer von 146 Tage) wurde das ECoG vom 105. Gestationstag (0,7 der Gestation) bis zum 136. Gestationstag (0,9 der Gestation) zur Untersuchung der elektrokortikalen Hirnreifung abgeleitet (Abb. 2). Betamethasonbehandlungen zur Untersuchung der Auswirkungen von Glukokortikoiden auf die elektrokortikale Hirnfunktion wurden am 106./107., 112./113. und am 118./119. Gestationstag durchgeführt und das ECoG zur weiteren Beobachtung der Betamethasoneffekte bis zum 130. Gestationstag untersucht. Postoperativ wurden bis zum Ende des Experimentes täglich Kontrollen der arteriellen Blutgase, des Hämoglobin-Wertes und der O_2 -Sättigung zur Überwachung des fetalen und mütterlichen Gesundheitszustandes durchgeführt. Die Untersuchung einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirnentwicklung fand bei 24 Tieren statt. Nach Randomisierung teilten wir die Schafe in folgende vier Gruppen auf:

Entwicklung der Schlafstadien:

7 Kontrolltiere, Aufzeichnung des ECoG's bis zum 136. Tag (0,9 der Gestation).

Akute Betamethasoneffekte:

9 Tiere mit einem Behandlungszyklus Betamethason am 111./112. Gestationstag (0,7 der Gestation), „Einfachbehandlung“, Aufzeichnung des ECoG's bis zum 114. Tag.

Chronische Betamethasoneffekte:

5 Tiere mit zwei Behandlungszyklen Betamethason am 106./107. (0,7 der Gestation) und 112./113. Gestationstag (0,75 der Gestation), Aufzeichnung des ECoG's bis zum 130. Tag.

3 Tiere mit drei Behandlungszyklen Betamethason am 106./107., 112./113. und 118./119. Gestationstag (0,8 der Gestation), Aufzeichnung des ECoG's bis zum 130. Tag. Da sich keine Unterschiede zu der Gruppe mit zwei Behandlungszyklen abzeichnete, wurde auf die Auffüllung der Gruppe verzichtet. Diese Tiere werden zur Gruppe „Mehrfachbehandlung“ zusammengefasst.

Aus Gründen des Tierschutzes sowie des hohen zeitlichen und finanziellen Aufwandes für die Experimente, in die mehrere Mitarbeiter involviert waren, erstellten wir nur eine Kontrollgruppe, die drei Behandlungszyklen mit NaCl erhielt. Die Auswirkung der NaCl Injektion (ca. 2 ml pro Gabe), die das Muttertier intramuskulär erhielt, kann als vernachlässigbar angesehen werden, so dass wir auf eine Kontrollgruppe mit einem und zwei Behandlungszyklen verzichteten.

Nach einer mindestens 4 tägigen postoperativen Erholungsphase für die Feten wurde am 105 ± 1 Gestationstag und damit 24h vor dem ersten Behandlungszyklus mit der Aufzeichnung von ECoG, dem fetalen Blutdruck, Amniondruck und dem mütterlichen arteriellen Blutdruck begonnen. Die experimentelle Phase begann bei den Kontrolltieren und den Tieren mit zwei oder drei Behandlungszyklen am 106 ± 1 Gestationstag, bei den Tieren mit nur einer Betamethasongabe am 111 ± 1 Gestationstag. Die NaCl- oder Betamethasongabe erfolgten um 12.00 Uhr ± 1 h, um zirkadiane Effekte auszuschließen, denen die endogene Kortisolsynthese und Glukokortikoidrezeptorempfindlichkeit unterworfen ist (Endo et al. 1990, Chapotot et al. 1998, Van Cauter und Refetoff 1985) (Abb. 2).

Am Versuchsende wurde das Muttertier erneut mit 4% Halothan anästhesiert. Anschließend wurde der Fetus durch einen Medianbauchschnitt und Uterusschnitt entnommen, durch Exsanguination getötet, und das Gehirn für histologische Untersuchungen entnommen (nicht Gegenstand der Arbeit). Die exakte Lage aller Katheter wurde kontrolliert.

Anschließend wurde das Muttertier in Deutschland durch eine intravenöse Magnesiumsulfatlösung und in den USA mit einer i.v. Injektion von 16% Pentobarbitallösung (Fatal plus, Vortech, USA) getötet.

4.3 Verwendete Glukokortikoide

Als Routinemedikation schwangerer Frauen bei drohender Frühgeburt vor der 32. SSW dienen auf Empfehlung des amerikanischen National Institutes of Health (NIH) die beiden synthetischen Glukokortikoide Betamethason und Dexamethason (NIH 1995). Sie weisen eine ähnliche Struktur und vergleichbare biologische Aktivität auf. Diese Wirksamkeit liegt auch beim hier verwendeten Tiermodell vor (Derks et al. 1997). In den durchgeführten Untersuchungen wurde Betamethason entsprechend den NIH-Empfehlungen für die klinische Anwendung mit $2 \times 110 \mu\text{g/kgKG}$ in einem Abstand von 24 Stunden dem Muttertier i.m. verabreicht (NIH 1995). Die i.m. Betamethasoninjektion erfolgte damit im Gegensatz zur Klinik gewichtsadaptiert. Die Dosis entsprach 8 mg Betamethason für eine 70 kg schwere Schwangere. Die Routinedosis bei Schwangeren in der Klinik beträgt $2 \times 8 - 12 \text{ mg}$ im Abstand von 24 Stunden.

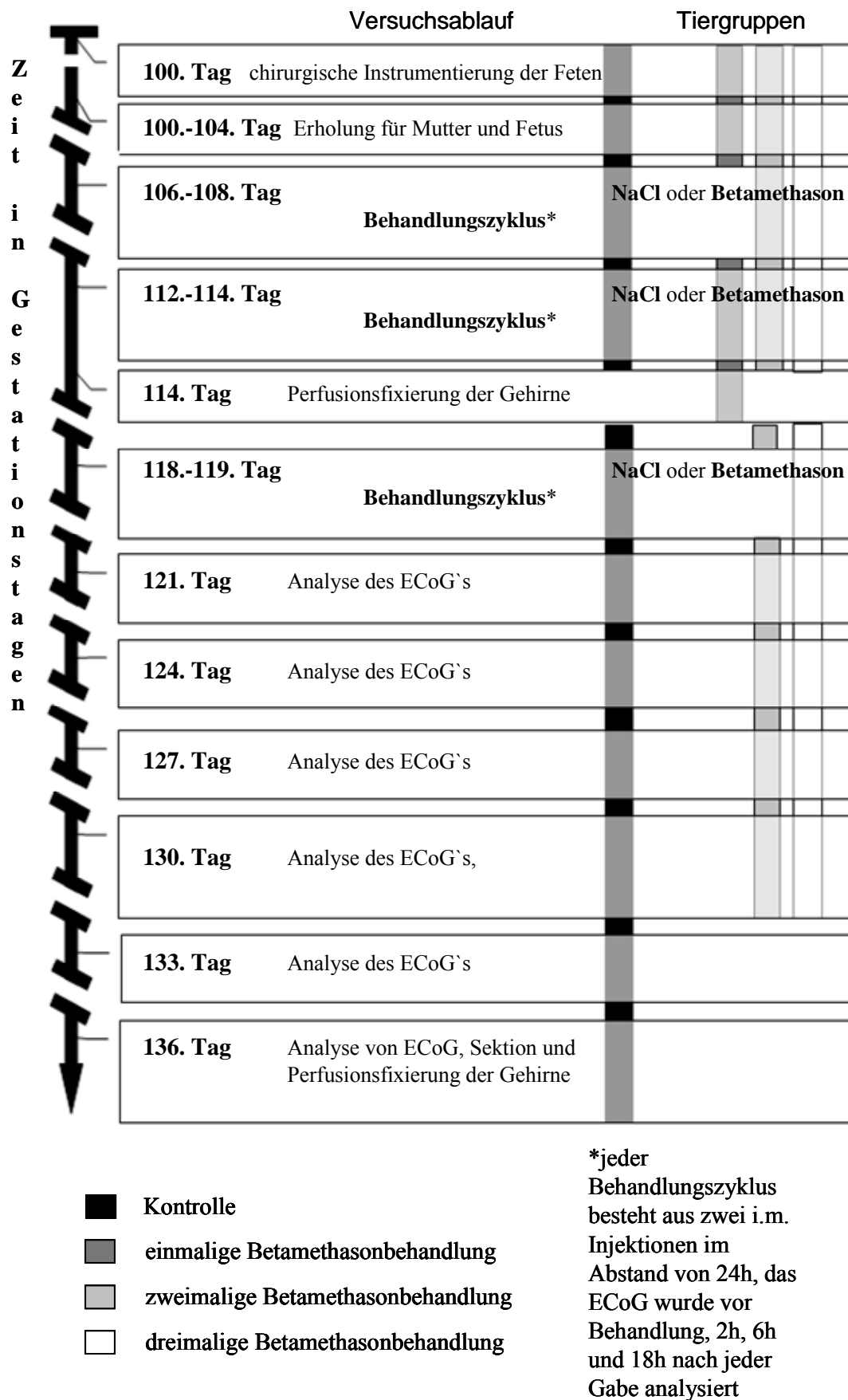


Abb. 2 Experimentelles Protokoll

4.4 Datengewinnung

Alle abgeleiteten physiologischen Parameter wurden verstärkt (Verstärker Modelle 5900 und 6600, Gould Instruments, Gould, USA), gefiltert (Bandbreiten für ECoG 0,3 – 100 Hz und für EKG: 30 – 300 Hz) und anschließend über einen A/D-Wandler (DT2801F, Data Translation, USA, bzw. DI-400-PGH, DATAQ Instruments, USA) digitalisiert und mittels des Messprogramms WINDAQ (DATAQ Instruments, Inc, USA) kontinuierlich auf einen PC aufgezeichnet.

Die Datenaufzeichnung erfolgte grundsätzlich kontinuierlich vom 105. bis zum 136. Gestationstag bei den Tieren, an denen die Untersuchungen zur Entwicklung der elektrokortikalen Hirnfunktion stattfanden, bis zum 114. Gestationstag bei den Tieren welche nur einen Behandlungszyklus Betamethason erhielten, und bis zum 130. Gestationstag bei den Tieren mit zwei oder drei Betamethasonbehandlungszyklen. Aufgrund der begrenzten Anzahl von Messplätzen und der langen Ableitdauer konnte ein Teil der Tiere zwischen dem 119. und 126. Tag nicht aufgezeichnet werden, Am 121. und 124. Gestationstag betrug deshalb die Zahl der ausgewerteten Tiere $n=5$ in der Kontrollgruppe.

4.5 Analyse des Elektrokortikogramms

4.5.1 Auswahl geeigneter ECoG-Abschnitte in Abhängigkeit vom Schlafstadium

Die elektrokortikale Hirnaktivität wird mit in die Kalotte implantierten Elektroden als Elektrokortikogramm (ECoG) von der Hirnoberfläche abgeleitet. Das ECoG wurde biparietal und bifrontal abgeleitet. Ausgewertet wurde jedoch nur das biparietale ECoG. Die Auswertung erfolgte durch Spektralanalyse sowie eine nichtlineare Analyse. Darüber hinaus fand eine Analyse der Zeitdauer der REM- und NREM-Schlafstadien statt. Für die spektrale und nichtlineare Analyse wurden an jedem Behandlungstag früh in den Morgenstunden (die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt ungestört von tierpflegerischen und experimentellen Aktivitäten) vor der Betamethasongabe, sowie 2h, 6h und 18h nach jeder Gabe jeweils sechs weitgehend artefaktfreie zehnminütige ECoG-Abschnitte ausgewählt. Nach der Entwicklung der Schlafstadien am 118. Gestationstag erfolgte die Auswahl für REM- und NREM-Schlaf getrennt. Nach dem letzten Behandlungszyklus am 118. und 119. Gestationstag wurde zur weiteren Verfolgung der Entwicklung elektrokortikaler Hirnfunktionen am 121., 124., 127. und 130. Gestationstag früh in den Morgenstunden jeweils sechs weitgehend artefaktfreie

zehnminütige ECoG-Abschnitte aus dem REM- und NREM-Schlaf ausgewählt. Zur Untersuchung der Reifung der elektrokortikalen Entwicklung unter Normalbedingungen wurde bei 6 Kontrolltieren die elektrokortikale Entwicklung zusätzlich noch am 133. und 136. Gestationstag untersucht. Dabei wurden insgesamt ca. 2500 ECoG-Abschnitte ausgewertet. Während der Uteruskontraktionen wurde das ECoG nicht analysiert, da die Uteruskontraktionen mit Änderungen in der elektrokortikalen Aktivität bis hin zu Schlafstadienänderungen einhergehen (Shinozuka und Nathanielsz 1998).

Vor dem 115. Gestationstag war eine Einteilung in REM- oder NREM-Schlaf anhand des ECoG's mit visueller Analyse noch nicht möglich. Zu diesem Zeitpunkt sind auch noch keine Ausprägungen des REM- oder NREM-Schlafes in anderen Verhaltensparametern beschrieben (Szeto und Hinman 1985 und eigene Voruntersuchungen).

Die Zuordnung zu den einzelnen Schlafstadien konnte ab dem 106. Gestationstag durch den Vorhersagefehler des ECoG's und ab dem 112. Gestationstag mit Hilfe der spektralen Eckfrequenz getroffen werden (siehe 4.5.3).

In der spektralen Analyse traten ab dem 112. Gestationstag deutlich sichtbare Schwankungen der Eckfrequenz auf. Die Bereiche im ECoG mit einer Eckfrequenz, die 10% über dem Mittelwert lagen, wurden dem unreifen REM-Schlaf und Bereiche, die 5% unter dem Mittelwert der Eckfrequenz lagen, dem unreifen NREM-Schlaf zugeordnet. Dabei wurden nur Abschnitte mit einer Minstdauer von 2 min zugeordnet. In der nichtlinearen Analyse konnte man schon ab dem 106. Gestationstag Schwankungen zwischen den unreifen ECoG-Schlafstadien ausmachen. Hier wurden bei fehlenden Änderungen des Frequenzspektrums die Bereiche mit einem Vorhersagefehler des ECoG's die 10% über dem Mittelwert lagen, dem Stadium der kortikalen Aktivierung zugeordnet, und Bereiche die 5% unter dem Mittelwert des Vorhersagefehlers des ECoG's lagen, dem Stadium der kortikalen Deaktivierung zugeordnet. Die Zuordnung zu den Schlafstadien erfolgte nach der Entwicklung von Verhaltensstadien am 115. – 117. Tag visuell anhand der ECoG-Amplitude. Das REM-Schlaf-ECoG konnte man an einem niedrigamplitudigen, hochfrequenten ECoG-Muster, das NREM-Schlaf-ECoG an einem hochamplitudigen, niedrigfrequenten ECoG-Muster erkennen. Die Zuordnung zu den Schlafstadien durch den Vorhersagefehler und die Eckfrequenz stimmte ab dem 118. Gestationstag mit den visuell zugeordneten Schlafstadien überein und konnte auch nach dem 118. Gestationstag, wo schon eine visuell sichtbare Schlafstadiendifferenzierung des ECoG möglich war, eingesetzt

werden. Ließen sich ECoG-Abschnitte nicht dem NREM- oder REM-Schlaf oder den unreifen Stadien zuteilen, betrachteten wir sie als “nicht klassifizierbare Schlafstadien”.

4.5.2 Analyse der Schlafstadiendauer

Die spektrale Eckfrequenz ermöglichte die sichere Einteilung der Schlafstadien in REM- und NREM-Schlaf (siehe 4.5.1). Nach der Zuordnung zu den jeweiligen Schlafstadien fand die Bestimmung der Länge der REM- und NREM-Schlafstadien statt. Wegen des Fehlens einer zyklischen ECoG-Aktivität im Frequenzspektrum am 106. Gestationstag wurde die Schlafstadienlänge zu diesem Zeitpunkt mit Hilfe des Vorhersagefehlers bestimmt.

Um einen chronischen Einfluss von Betamethason auf die Dauer des REM- und NREM-Schlafes zu untersuchen, wurde am 106., 112. und 130. Gestationstag die Länge der Schlafstadien zwischen 24:00 und 6:00 Uhr bestimmt und jeweils die mittlere Länge der Schlafstadien angegeben.

Mit der Bestimmung der Schlafstadien vor dem 2. Behandlungszyklus, zu dem Zeitpunkt an dem die Effekte von Betamethason auf die Leistungsspektralanalyse und die Vorhersagbarkeit maximal waren, konnten die chronischen Effekte des erster Behandlungszyklus am 106. und 107. Gestationstag untersucht werden. Durch die Bestimmung der Schlafstadiendauer am 130. Gestationstag konnten wir auch die chronischen Effekte einer wiederholten Behandlung aufzeigen.

Zur Untersuchung der akuten Glukokortikoideffekte auf die Schlafstadienlänge wurde das zirkadiane Verhalten der einzelnen Schlafphasen am 111., 112. und 113. Gestationstag über jeweils 24 Stunden untersucht. Dazu wurde das ECoG über 24h vor und jeweils 24h nach den Betamethasongaben am 112. und 113. Gestationstag untersucht und die mittlere Länge der Schlafstadien zwischen 12:00 bis 18:00 Uhr, 18:00 bis 24:00 Uhr, 24:00 bis 6:00 Uhr und zwischen 6:00 bis 12:00 Uhr angegeben.

4.5.3 Leistungsspektralanalyse des ECoG's

Die Fast-Fourier-Transformation gilt als Standardmethode zur Qualifizierung der spektralen Leistung des zur Quantifizierung der hirnelektrischen Aktivität gemessenen ECoG's. Zur

Berechnung der spektralen Leistungen kam die Analysesoftware ATISA für WINDOWS (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland) zum Einsatz. Die jeweils 10 minütigen ECoG-Abschnitte (siehe 4.5.1) wurden in 150 sich nicht überlappende Abschnitte von 4 sec Länge geteilt. Durch Mittelung der Periodogramme der unmittelbar aufeinander folgenden Abschnitte von 4 sec Dauer konnte das ECoG quantifiziert werden. Eine Artefakteliminierung erfolgte anschließend durch visuelle Kontrolle. Die spektrale Leistung wurde in folgenden Frequenzbändern berechnet: Gesamtleistung (1,5 – 30 Hz), Deltaband (1,5 – 4 Hz), Thetaband (4 – 8 Hz), Alphanband (8 – 13 Hz) und Betaband (13 – 30 Hz). Zusätzlich wurde die Eckfrequenz des Gesamtbandes ermittelt. Die Eckfrequenz gilt als sensibler Parameter bei der Leistungsspektralanalyse des fetalen ECoG's und wird als die Frequenz definiert, unterhalb der sich 95% der spektralen Leistung befindet (Szeto 1990). Der große Unterschied in den gemessenen spektralen Absolutleistungen war auf den unterschiedlich tiefen Sitz der Schraubenelektroden und auf Dickenunterschieden des Schädelknochens zurückzuführen. Für den interindividuellen Vergleich der absoluten ECoG-Leistungen wurden diese normiert, indem sie zur Ausgangsleistung ins Verhältnis gesetzt wurden. Die absolute ECoG-Leistung ist für die Darstellung der Ontogenese der elektrischen Hirnaktivität über einen längeren Zeitraum ungeeignet, da deren Änderungen während der Entwicklung durch nichtneuronale Faktoren wie die Kalzifizierung der Kalotte und ihr Dickenwachstum beeinflusst wird. Aus diesem Grund fand die Normierung und Auswertung der Absolutwerte der spektralen Leistung nur bei den 6 Kontrolltieren, bei denen das ECoG bis zum 136. Gestationstag ausgewertet wurde, zwischen dem 127. und 136. Gestationstag statt. Für die Darstellung der Ontogenese der elektrischen Hirnaktivität und deren Beeinflussung durch Glukokortikoide wurde die relative spektrale Leistung errechnet, die dem prozentualen Anteil der spektralen Leistung einzelner Frequenzbänder an der Gesamtleistung entspricht.

4.5.4 Nichtlineare ECoG-Analyse

Das fetale ECoG ist ein komplexes Signal, das neben linearen auch nichtlineare Eigenschaften besitzt und deshalb allein durch die Anwendung linearer Methoden wie z.B. die Leistungsspektralanalyse nicht vollständig zu beschreiben ist (Schwab et al. 2000a). Zur Analyse dieser nichtlinearen Eigenschaften des fetalen ECoG's entwickelte Frau Dipl.-Math. K. Schwab (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland) einen Algorithmus zur Schätzung eines so genannten

Punktvorhersagefehlers, der auf dem Wolf-Algorithmus für die Schätzung des führenden Lyapunov Exponenten basiert (Schmidt et al. 1997, Schmidt et al. 1999, Schwab et al. 2000b). Dabei wird die lokale exponentielle Divergenz benachbarter Trajektorien im Phasenraum geschätzt (Gao und Zheng 1994). Sie ist ein Maß für die theoretische Vorhersagbarkeit der untersuchten Zeitreihe und spiegelt die Kausalität und damit die Komplexität der untersuchten Zeitreihe wider.

In einer Vorverarbeitungsroutine wurde das Frequenzspektrum der 10 min ECoG-Abschnitte durch einen FIR-Filter auf 0,5 Hz – 30 Hz beschränkt, zusätzlich reduzierten wir die Datenlänge der gefilterten ECoG-Abschnitte auf 64 Hz, um den nicht unerheblichen Rechenaufwand in vertretbaren Grenzen zu halten. Die Abtastfrequenz entsprach damit immer noch gemäß dem Nyquist- Theorem mehr als dem doppelten der obersten zu analysierenden Frequenz. In einer Testreihe ergab sich kein Unterschied der berechneten Vorhersagbarkeit zwischen ECoG-Files mit 128 oder 64 Hz Abtastrate.

Theoretischer Ausgangspunkt des angewandten Schätzalgorithmus zur Quantifizierung eines nichtlinearen Vorhersagefehlers ist eine eindimensionale zu untersuchende Zeitreihe $\{x(t_i)\}_{i=1, \dots, n}$ (in diesem Fall die zu untersuchenden ECoG-Abschnitte). Mit Hilfe eines Verzögerungsparameters τ lässt sich eine derartige Zeitreihe in einen mehrdimensionalen Phasenraum übertragen (Takens 1981). Diese Transformation erfolgt als:

$$Y(t_i) = \{x(t_i), x(t_i - \tau), \dots, x(t_i - (D_e - 1)\tau)\}, \quad (1)$$

Wobei $i=1, \dots, (D_e-1)*\tau$ gilt und τ die Verzögerungszeit, t_i den aktuellen Zeitpunkt, D_e die Einbettungsdimension, $\{x(t_i)\}_{i=1, \dots, n}$ die gemessene Zeitreihen und $\{Y(t_{ij})\}_{i=1, \dots, n-(D_e-1)\tau}$ die Trajektorien im Phasenraum bezeichnet.

Beginnend mit einem beliebigen Punkt $y(t_i)$ wird nach dem nächsten (im euklidischen Sinne) Nachbarn im Phasenraum gesucht. Die Entfernung dieses Punktes zum Ausgangspunkt ist $D(t_i)$. Nach Ablauf einer spezifischen Entwicklungszeit k beträgt die Entfernung zwischen diesen beiden Punkten $D'(t_{i+k})$. Diese Prozedur wird für jeden Punkt $y(t_i)$ im Phasenraum wiederholt. Entsprechend der folgenden Formel können die einzelnen nichtlinearen Vorhersagefehler $\{PVF_i\}_{i=1, \dots, n-(D_e-1)\tau-k}$ dann für jeden Zeitpunkt i berechnet werden:

$$VF_i = \frac{f}{k} \log_2 \frac{D'(t_{i+k})}{D(t_i)}. \quad (2)$$

Dabei gilt: $i=1, \dots, n-(D_e-1)\tau-k$ und t_i bezeichnet den aktuellen Zeitpunkt, $D(t_i)$ gibt den kleinsten Euklidischen Abstand zum Zeitpunkt t_i , $D'(t_{i+k})$ den entwickelten Abstand zum Zeitpunkt t_{i+k} , k die spezifische Entwicklungszeit, f die Abtastrate und VF_i die einzelnen geschätzten Vorhersagefehler an.

Aufgrund der logarithmischen Beziehung (2) bewirken kleine Änderungen in den Anfangsbedingungen große Veränderungen über die Zeit. Die Gleichung (2) ist damit ein Maß für die lokale exponentielle Divergenz bzw. Konvergenz benachbarter Trajektorien im Phasenraum. $D'(t_{i+k}) > D(t_i)$ ist äquivalent zu einer Divergenz der untersuchten Punkte im Phasenraum. Es resultiert $VF_i > 0$. Eine niedrige Vorhersagbarkeit oder Kausalität geht mit einem hohen positiven Wert des Vorhersagefehlers, ein periodischer oder quasiperiodischer Prozess oder eine Konvergenz dagegen mit Annäherung an einen Gleichgewichtszustand $VF_i \leq 0$ einher.

Der absolute Wert des Vorhersagefehlers hängt wie bei allen nichtlinearen Verfahren von einer ausreichenden Länge des zu untersuchenden ECoG-Signals und verschiedenen speziellen Parametern wie der Einbettungsdimension D_e , dem Verzögerungsparameter τ und der Entwicklungszeit k ab. Die gewählten Parameter müssen dabei insbesondere die gesamte Spannweite des Aktivitätsniveaus, das im zu untersuchenden ECoG-Signal enthalten ist, widerspiegeln. Für eine eins-zu-eins Transformation der gemessenen eindimensionalen Zeitreihe in einen multidimensionalen Phasenraum ist eine Einbettungsdimension von $D_e = 2 * CD$ (CD bezeichnet die Korrelationsdimension des zu untersuchenden Prozesses) nötig (Sauer und Casdagli 1991). Als Zeitverzögerung τ wählten wir den ersten Zeitpunkt, für den gilt, dass die Autokorrelationsfunktion $ACF = 1/e$ ist (Abarbanel et al. 1990, Albano et al. 1988). Die Entwicklungszeit k wurde so gewählt, dass sie die unterschiedlichen Frequenzverteilungen des ECoG's im REM- und NREM-Schlaf dahingehend berücksichtigt, dass ähnliche Anteile der relativen spektralen Leistungen in beiden Schlafstadien widergespiegelt werden. Nach sorgfältiger Testung aller Parameter wurde eine Einbettungsdimension von 16, eine Verzögerungszeit von 150 msec und eine Entwicklungszeit von 75 msec gewählt. ECoG-Abschnitte von 10 min Dauer (entsprechend 38400 Datenpunkten bei der gewählten Abtastfrequenz von 64 Hz) erwiesen sich als ausreichend für die Berechnung des Punktvorhersagefehlers.

Praktisch wurde für jeden Zeitpunkt der jeweiligen ECoG-Abschnitte der Vorhersagefehler, d.h. die theoretische Vorhersagbarkeit hinsichtlich des weiteren Zeitreihenverlaufes, entsprechend Gleichung (2) geschätzt. Die daraus resultierende Zeitreihe der einzelnen Vorhersagefehler wurde mit einem Rechteckfenster geglättet (Fensterlänge 256 Datenpunkte bzw. 4 sec) und anschließend über die jeweils interessierenden ECoG-Abschnitte gemittelt, um einen mittleren Vorhersagefehler für jeden zu untersuchenden ECoG-Abschnitt zu erhalten.

4.6 Statistische Verfahren

Die Spektralwerte im ECoG folgen keiner Normalverteilung, die Verteilung der Schlafstadiendauer und des Vorhersagefehlers des ECoG sind unbekannt. Deshalb kamen zur statistischen Untersuchung auf Signifikanz nichtparametrische Tests zur Anwendung. Der Vergleich auf Mittelwertsunterschiede zwischen den Tiergruppen für die Spektralparameter, die Schlafstadienlänge und die Vorhersagefehler des ECoG's wurde mit dem U-Test von Mann & Whitney durchgeführt. Zur Prüfung auf Veränderung in der zentralen Tendenz innerhalb der Versuchsgruppen für die genannten Parameter fand der Vorzeichen-Test Verwendung. Die Ergebnisse sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) dargestellt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Die statistische Betrachtung der untersuchten Parameter über einen Zeitverlauf führte zu mehrfachen Tests zwischen den Tiergruppen bzw. innerhalb einer Versuchsgruppe. Um das multiple Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ einzuhalten, wurde das Korrekturverfahren von Holm verwendet (Holm 1979). Zur Diskussion des multiplen Signifikanzniveaus und über die Fehlerhäufigkeit bei der EEG- Auswertung wird auf (Hemmelmann et al. 2005) verwiesen.

5 Ergebnisse

5.1 Physiologische Parameter

Während der Untersuchungen befanden sich alle Tiere in einem guten Allgemeinzustand. Weder klinisch noch elektromyographisch waren Zeichen einer spontanen Geburt zu erkennen.

Die arteriellen Blutgase, pH, O₂%, pCO₂ und pO₂ waren während des gesamten Experimentes unverändert und zeigten zwischen der Kontroll- und den mit Betamethason behandelten Gruppen keine Differenzen. Der Hb-Wert stieg bei den Kontrolltieren entwicklungsbedingt im Verlauf leicht an ($p < 0,05$), (Tab. 1). Nur bei den Tieren mit Einfachbehandlung lag der Ausgangs-Hb-Wert vor der Betamethason Behandlung über dem Wert der Kontrollgruppe ($p < 0,05$; Tab. 1).

5.2 Entwicklung der Schlafstadien

Die Entwicklung der Schlafstadien wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen vom 106. (0,7 der Gestationsdauer) bis zum 136. Gestationstag (0,9 der Gestationsdauer) untersucht.

Visuell konnte man im ECoG zwischen dem 106. und 115. Gestationstag noch keine zyklische Aktivität unterscheiden, erst ab dem 118. Gestationstag konnte im ECoG visuell zwischen einem niedrigamplitudigen, hochfrequenten und einem hochamplitudigen, niedrigfrequenten ECoG-Muster, welche dem sich entwickelnden REM- und NREM-Schlaf entsprachen, unterschieden werden (Abb. 3).

In der nichtlinearen Analyse war eine zyklische Aktivität mit Phasen höherer und niedrigerer Vorhersagefehler bereits am 106. Gestationstag nachweisbar (Abb. 3). In der Leistungsspektralanalyse war eine zyklische Aktivität der spektralen Eckfrequenz erst ab dem 112. Gestationstag nachweisbar (Abb. 3). Die bis zum 112. Gestationstag auftretende zyklische Aktivität des Vorhersagefehlers ohne zyklischer Änderungen des Frequenzspektrums spiegelte unreife Schwankungen zwischen Abschnitten kortikaler Aktivierung und Deaktivierung (zur Definition der kortikalen Aktivierung und Deaktivierung siehe 4.5.1) wider, ohne dass die über das Frequenzspektrum definierten Kriterien für REM- oder NREM-Schlaf (siehe unten) erfüllt wurden.

| | | Kontrollen | Betamethasontiere Mehrfachbehandlung | Betamethasontiere Einfachbehandlung |
|----------------------------------|---------------------------------------|------------|---|--|
| pH | vor 1. Zyklus | 7,34±0,00 | 7,36±0,00 | |
| | vor 2. Zyklus | 7,36±0,01 | 7,34±0,00 | 7,36±0,00 |
| | vor 3. Zyklus | 7,36±0,01 | 7,34±0,01 | |
| | 4 Wochen nach dem ersten Zyklus | 7,35±0,00 | 7,34±0,01 | |
| pCO₂ (mmHg) | vor 1. Zyklus | 46,6±1,9 | 44,0±1,7 | |
| | vor 2. Zyklus | 46,2±1,0 | 46,6±1,0 | 51,0±2,6 |
| | vor 3. Zyklus | 45,2±1,2 | 44,9±1,6 | |
| | 4 Wochen nach dem ersten Zyklus | 49,5±0,9 | 49,1±2,7 | |
| pO₂ (mmHg) | vor 1. Zyklus | 24,1±1,9 | 29,0±0,7 | |
| | vor 2. Zyklus | 26,1±1,9 | 23,4±2,1 | 24,7±1,0 |
| | vor 3. Zyklus | 23,9±1,9 | 31,0±1,8 | |
| | 4 Wochen nach dem ersten Zyklus | 24,0±2,5 | 22,6±1,6 | |
| O₂% | vor 1. Zyklus | 73,3±6,1 | 80,6±3,8 | |
| | vor 2. Zyklus | 68,8±5,6 | 65,8±4,0 | 72,0±2,5 |
| | vor 3. Zyklus | 65,0±6,5 | 75,4±6,4 | |
| | 4 Wochen nach dem ersten Zyklus | 69,3±5,1 | 66,3±6,5 | |
| Hb (g/dl) | vor 1. Zyklus | 6,37±0,6 | 6,9±0,9 | |
| | vor 2. Zyklus | 6,12±0,4 | 6,61±0,8 | 8,64±0,5 ^{\$} |
| | vor 3. Zyklus | 6,52±0,5 | 6,45±1,0 | |
| | 4 Wochen nach dem ersten Zyklus | 8,56±0,3 * | 7,93±0,9 | |

Tab. 1 Physiologische Variablen jeweils vor Beginn der NaCl- bzw. Betamethasongabe.

n=7 in der Kontrollgruppe, n=8 in der Gruppe mit Mehrfachbehandlung, n=9 in der Gruppe mit Einfachbehandlung; MW ± SEM; * p<0,05 im Vergleich zum 106. Gestationstag; ^{\$} p<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

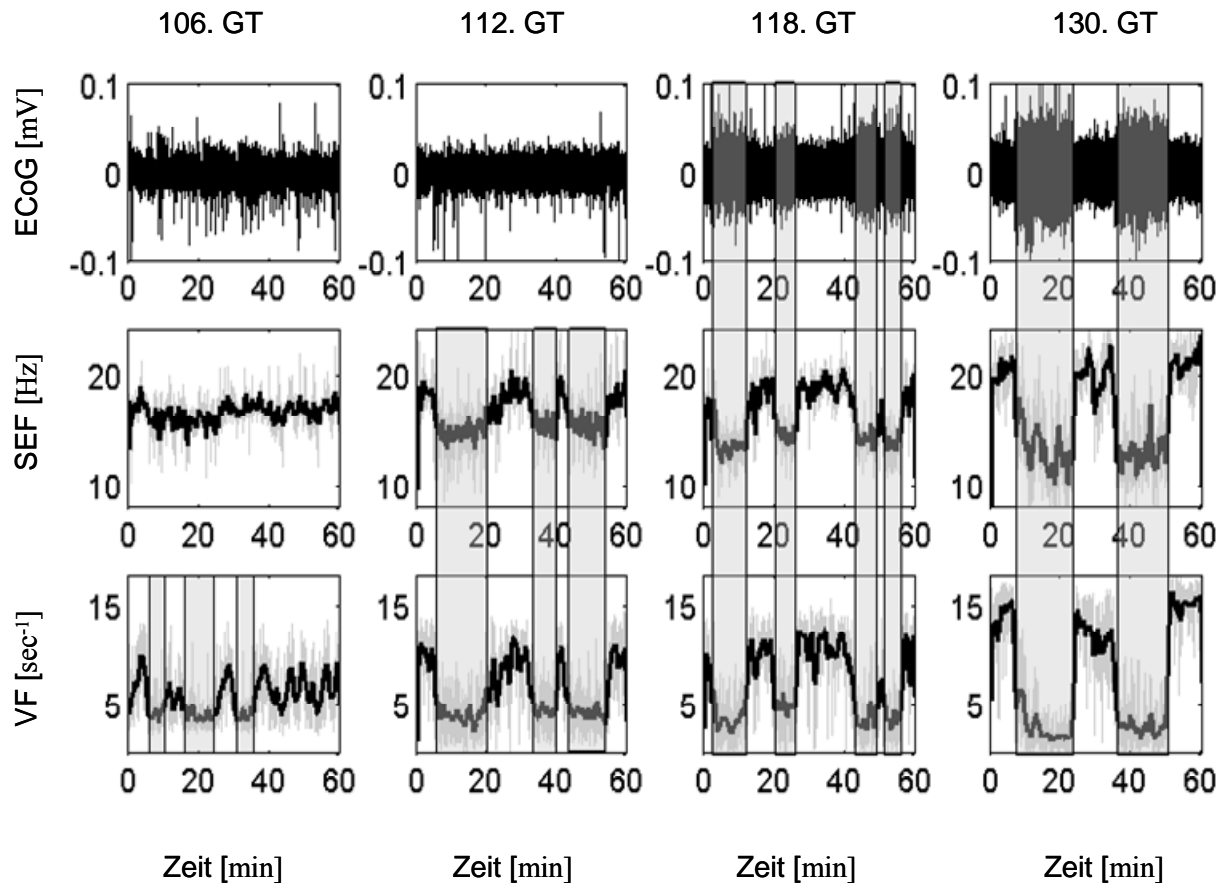


Abb. 3 Änderung des ECoG's, der spektralen Eckfrequenz (SEF) und des Vorhersagefehlers (VF) im zeitlichen Verlauf zwischen dem 106. und 130. Gestationstag (GT).

Im ECoG kann man am 106. und 112. Gestationstag noch keine zyklische Aktivität differenzieren. Mit Hilfe der SEF ist eine Unterscheidung von zyklischer Aktivität schon am 112. Gestationstag und mit Hilfe des VF schon am 106. Gestationstag möglich.

Abgrenzbare Phasen der kortikalen Deaktivierung oder des sich entwickelnden NREM-Schlafes nach dem 112. Gestationstag sind grau hinterlegt.

Ab dem 112. Gestationstag konnte eine zyklische Aktivität im Frequenzinhalt des ECoG's nachgewiesen werden ($p < 0,05$; Abb. 3 und 4). Diese zyklische Aktivität spiegelt die beginnende Entwicklung des NREM-Schlaf-ECoG's wider, da die ECoG-Aktivität zwischen dem unreifen Frequenzmuster und einem hochamplitudigen, niedrigfrequenten ECoG-Muster, welches typisch für den NREM-Schlaf ist, schwankte. Die für das REM-Schlaf-ECoG typischen niedrigamplitudigen, hochfrequenten ECoG-Muster fanden sich nicht ($p < 0,05$; Abb. 3 und 4).

Parallel dazu fiel ab dem 118. Gestationstag der Vorhersagefehler kontinuierlich in den ECoG-Abschnitten mit einer hohen Vorhersagbarkeit und Stabilität, welche den sich entwickelnden hochamplitudigen, niedrigfrequenten ECoG-Mustern entsprachen, ab. Damit spiegelt auch der Vorhersagefehler die Entwicklung des NREM-Schlaf-ECoG's wider ($p < 0,05$; Abb. 5). Die scheinbar zeitigere Entwicklung des für das NREM-Schlaf-ECoG

typischen Frequenzspektrums (Abb. 4), als der für das NREM-Schlaf-ECoG typische Abfall der nichtlinearen Stabilität (Abb. 5), ist ein technischer Artefakt, da die entwicklungsbedingten Änderungen zum 106. Gestationstag verglichen wurden, an welchem bereits der Vorhersagefehler, aber nicht das ECoG-Frequenzspektrum zyklische Aktivität zeigte.

Die spektrale Eckfrequenz nahm im sich entwickelnden NREM-Schlaf-ECoG kontinuierlich vom 112. Tag bis zum 136. Gestationstag ab (Abb. 4). Die Abnahme der spektralen Eckfrequenz war auf eine Zunahme der relativen spektralen Leistung im Deltaband und eine Abnahme der relativen spektralen Leistung in den anderen Frequenzbändern (Alpha-, Beta- und Thetaband) zurückzuführen (Abb. 6). Als Ursache könnte eine Zunahme der absoluten spektralen Leistung im Deltaband oder eine Abnahme der absoluten spektralen Leistung in den anderen Bändern verantwortlich sein. Zur Differenzierung wurden die Absolutwerte der spektralen Leistung zwischen dem 127. und 136. Gestationstag berechnet. Über einen längeren Zeitraum und gerade bei jüngeren Feten konnten die Absolutwerte der spektralen Leistung aufgrund der ontogenetisch bedingten Kalzifizierung und des Dickenwachstums der Kalotte im Untersuchungszeitraum nicht verglichen werden. Die Absolutwerte der spektralen Leistung stiegen im NREM-Schlaf-ECoG zwischen dem 127. und 136. Gestationstag im Delta-, Theta- und Alphaband an ($p < 0,05$), wobei die absolute spektrale Leistung im Delta- und Thetaband um das 2,6 fache und im Alphaband nur um das 1,6 fache zunahm. Die Zunahme der Aktivität in den langsamen Bändern war damit die Ursache für den Abfall der Eckfrequenz im NREM-Schlaf-ECoG (Abb. 4 und 6).

Bis zum 130. Gestationstag wechselte der ECoG-Frequenzinhalt zwischen dem sich entwickelnden NREM-Schlaf und einem unreifen ECoG-Muster, welches sich seit dem 106. Gestationstag nicht veränderte hatte. Ab dem 130. Gestationstag spiegelten Phasen mit einem niedrigamplitudigen, hochfrequenten ECoG-Muster, verbunden mit einem Anstieg der spektralen Eckfrequenz, die Entwicklung des REM-Schlaf-ECoG's aus den unreifen ECoG-Mustern heraus wider ($p < 0,05$, Abb. 4). Dabei kam es zu einer Zunahme der spektralen Eckfrequenz ($p < 0,05$, Abb. 4). Dieser Anstieg der Eckfrequenz beruht auf einer Verschiebung der relativen spektralen Leistung vom langsameren Delta- in das schnellere Theta- und Betaband, (Abb. 6). In der absoluten spektralen Leistung zwischen dem 127. und 136. Gestationstag blieb die Leistung im Delta- und Thetaband konstant, während die absolute spektrale Leistung im Alpha- und Betaband am 136. Gestationstag anstieg ($p < 0,05$; Abb. 6).

Parallel dazu stieg der Vorhersagefehler in den Abschnitten mit einer niedrigen Vorhersagbarkeit und Stabilität, welche den sich entwickelnden niedrigamplitudigen, hochfrequenten ECoG-Mustern entsprachen. Damit spiegelt auch der Vorhersagefehler die Entwicklung des REM-Schlaf-ECoG's ab dem 127. Gestationstag wider ($p < 0,05$; Abb. 5).

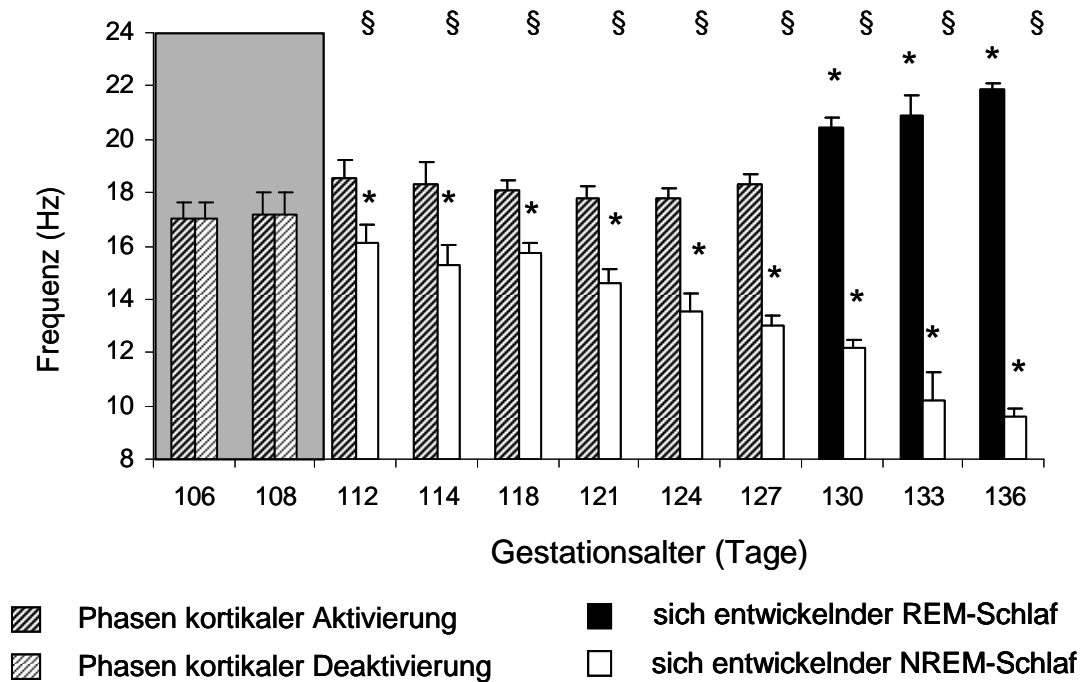


Abb. 4 Entwicklung der spektralen Eckfrequenz des ECoG's im REM- und NREM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 136. Gestationstag.

Am 106. und 108. Gestationstag war mittels der Spektralanalyse noch keine zyklische Aktivität nachweisbar (grau hinterlegt), jedoch Phasen kortikaler Aktivierung und Deaktivierung in der nichtlinearen Analyse (Abb. 5). Aus diesem Grund ist die Eckfrequenz in den Phasen kortikaler Aktivierung und Deaktivierung gleich hoch. Die Änderung der Eckfrequenz zwischen dem 108. und 112. Tag ist auf die nun mögliche Klassifizierung der Schlafstadien mittels der Spektralanalyse zurückzuführen.

n=7; MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum 106. Gestationstag; § $p < 0,05$ im Vergleich zum REM-Schlaf.

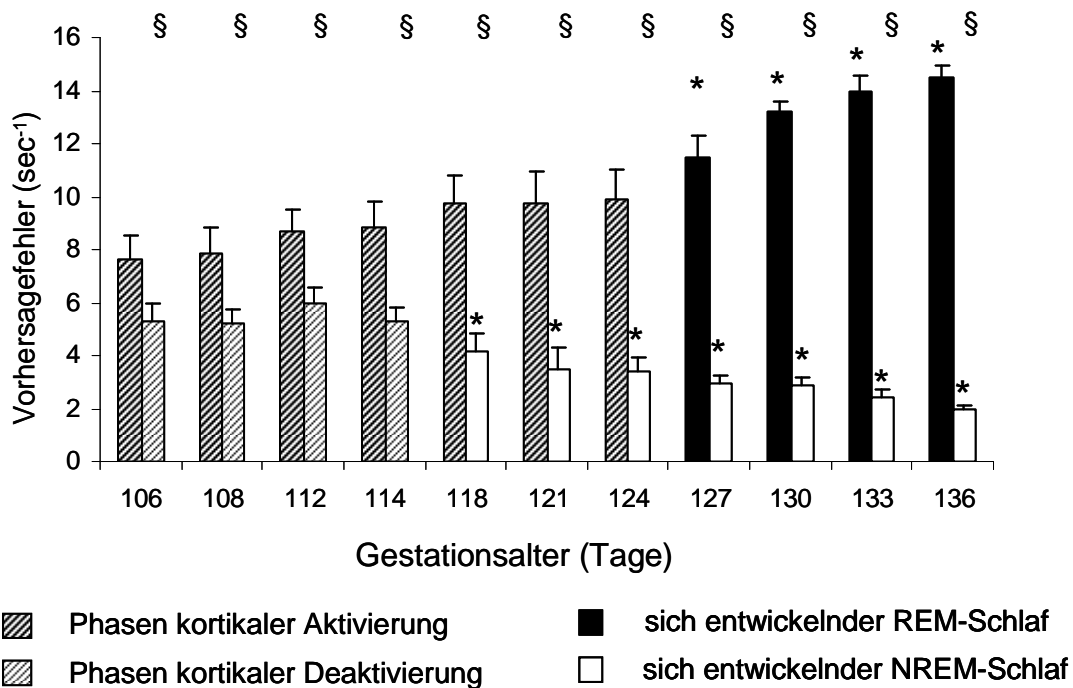


Abb. 5 Entwicklung des Vorhersagefehlers des ECoG's im REM- und NREM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 136. Gestationstag.

Die Phasen kortikaler Aktivierung und Deaktivierung sind durch eine zyklische Zunahme bzw. Abnahme des Vorhersagefehlers ohne parallele Änderungen des Frequenzspektrums definiert (siehe 4.5.1).

n=7; MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum 106. Gestationstag; § $p < 0,05$ im Vergleich zum REM-Schlaf.

Die Entwicklung der Frequenzinhalte und der nichtlinearen Eigenschaften des REM- und NREM-Schlaf-ECoG's wurde von einer Zunahme der Schlafstadienlänge im sich entwickelndem REM- und NREM-Schlaf zwischen dem 112. und 130. Gestationstag begleitet ($p < 0,05$; Abb. 7). Der Anteil der Phasen kortikaler Aktivierung und Deaktivierung betrug am 106. Tag 51% der Gesamtzeit und stieg bis zum 112. Gestationstag auf mehr als 80% der Gesamtzeit an (Abb. 7). Auch die absolute Länge der Schlafstadien stieg in den Phasen der kortikalen Aktivierung / REM-Schlaf zwischen dem 106. und 130. Gestationstag von 258 sec auf 1221 sec an. In den Phasen der kortikalen Deaktivierung / NREM-Schlaf steigerte sich die absolute Länge der Schlafstadien von 235 sec am 106. auf 1018 sec am 130. Gestationstag. Die Länge der Phasen kortikaler Aktivierung und Deaktivierung nahm somit vom 106. zum 112. Gestationstag sehr stark zu (in den Abschnitten kortikaler Aktivierung 4,8 – facher Anstieg, in den Abschnitten kortikaler Deaktivierung 4,0 – facher Anstieg), ($p < 0,05$; Abb. 7). Ab dem 112. Gestationstag waren die Phasen kortikaler Aktivierung signifikant länger als die sich entwickelnden NREM-Schlafstadien, ($p < 0,05$; Abb. 7). Die nicht klassifizierbaren Schlafstadien nahmen kontinuierlich vom 106. zum 130. Gestationstag ab ($p < 0,05$; Abb. 7).

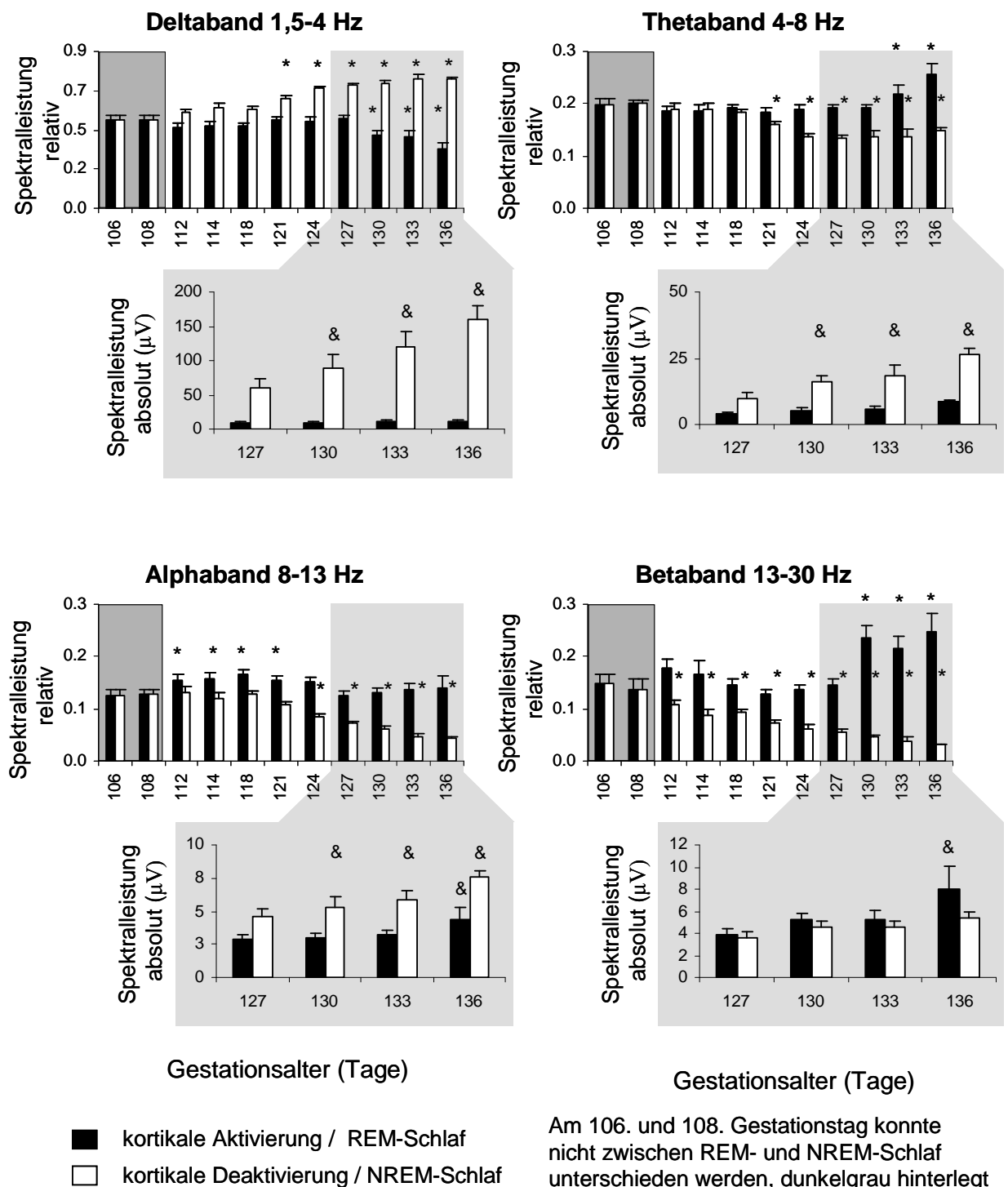


Abb. 6 Entwicklung der spektralen Leistung des ECoG's in den einzelnen Frequenzbändern im REM- und NREM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 136. Gestationstag, die weißen Diagramme stellen die relativen Leistungen dar, die Gesamtleistung ergibt 1,0; die hellgrau hinterlegten Diagramme stellen Absolutwerte der spektralen Leistung zwischen dem 127. und 136. Gestationstag dar.

n=7; MW+SEM; * p<0,05 im Vergleich zum 106. Gestationstag; & p<0,05 im Vergleich zum 127. Gestationstag.

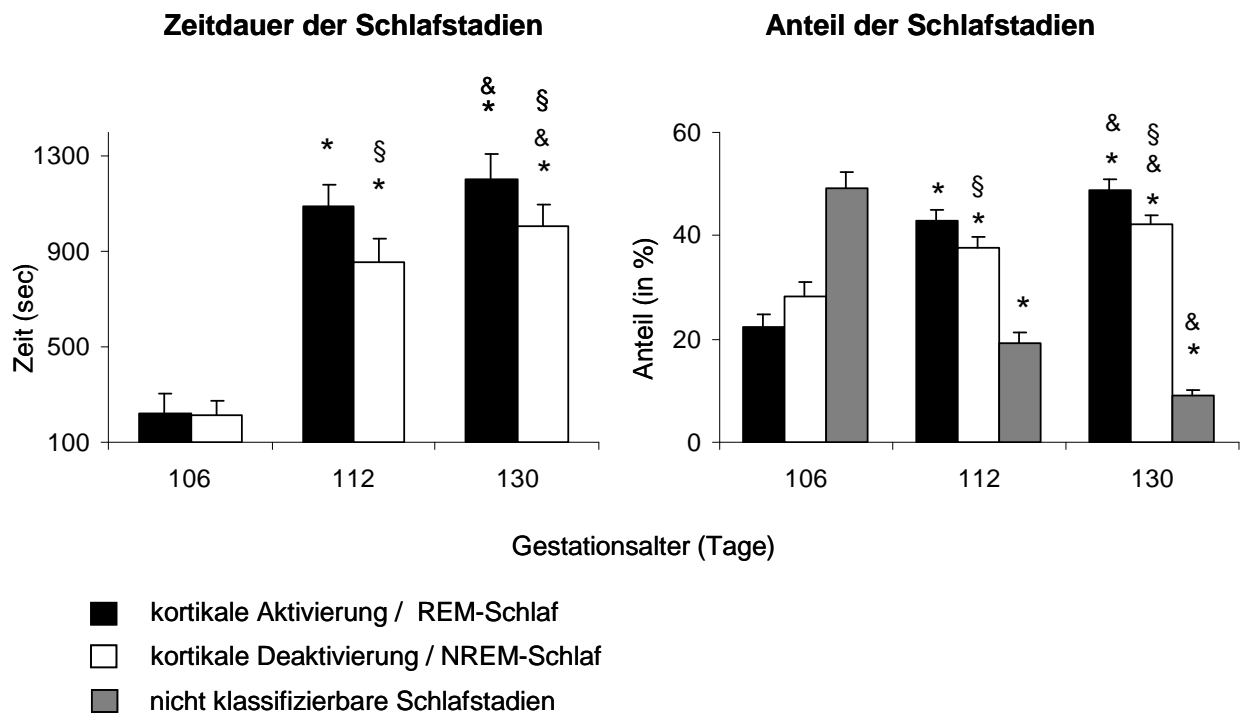


Abb. 7 Entwicklung der Schlafstadienlänge und des prozentualen Anteils der einzelnen Schlafstadien des ECoG's im sich entwickelnden REM- und NREM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 127. Gestationstag.

n=7; MW+SEM; * p<0,05 im Vergleich zum 106. Gestationstag; & p<0,05 im Vergleich zum 112. Gestationstag § p<0,05 im Vergleich zum sich entwickelnden REM-Schlaf.

5.3 Einfluss von Glukokortikoiden auf die Schlafstadienentwicklung (Chronische Effekte einer pränatalen Betamethasonbehandlung)

Es wurden 2 oder 3 Behandlungszyklen mit Betamethason im Abstand von je einer Woche verabreicht. Jeder Behandlungszyklus bestand aus zwei mütterlichen intramuskulären Betamethasongaben im Abstand von 24h. Die Analyse des ECoG's erfolgte alle 3 – 4 Tage bis zum 130. Gestationstag.

Da der zweite und dritte Behandlungszyklus mit Betamethason am 112. und 118. Gestationstag keine weitere Änderung der Eckfrequenz zeigte, und diese auch bei Erhöhung der Tierzahl nicht zu erwarten war, wurden die Tiere mit zwei und drei Behandlungszyklen in der Auswertung zusammengefasst (Abb. 8 und 9). Darüber hinaus hatte die Betamethasonbehandlung am 118. Gestationstag keine akuten Effekte auf das Leistungsspektrum und den Vorhersagefehler des ECoG's (siehe 5.4.3).

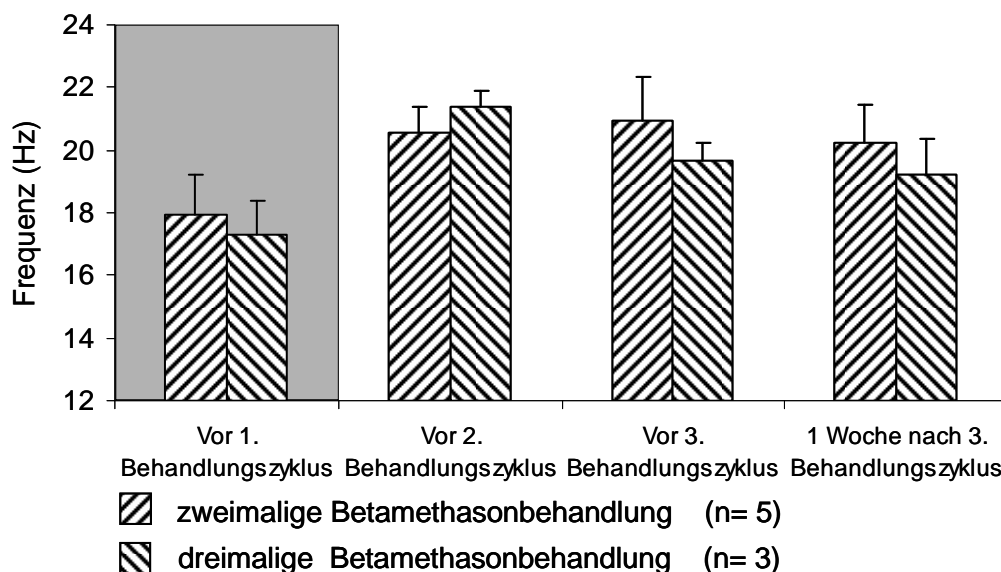


Abb. 8 Vergleich der Effekte einer Zweimal- (am 106. und 112. Gestationstag, n=5) und Dreimalbehandlung (am 106., 112. und 118. Gestationstag, n=3) mit Betamethason auf die Entwicklung der spektralen Eckfrequenz im REM-Schlaf-ECoG.

Die Zwei- und die Dreimal Betamethasonbehandlung führten zur gleichen Frequenzzunahme, Statistik aufgrund des kleinen n nicht möglich.

Am 106. Gestationstag (vor dem 1. Behandlungszyklus) wurde nicht zwischen REM- und NREM-Schlaf getrennt (grau hinterlegt) 2. Behandlungszyklus am 112. Gestationstag, 3. Behandlungszyklus am 118. Gestationstag; MW+SEM.

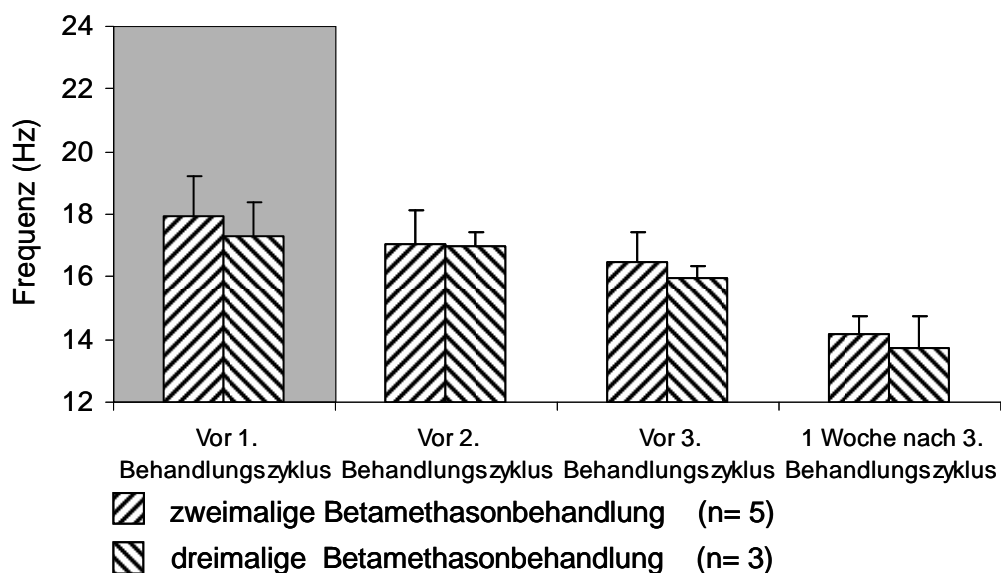


Abb. 9 Vergleich einer Zweimal- (am 106. und 112. Gestationstag, n=5) und Dreimalbehandlung (am 106., 112. und 118. Gestationstag, n=3) mit Betamethason auf die Entwicklung der spektralen Eckfrequenz im NREM-Schlaf-ECoG.

Sowohl die Zwei- als auch die Dreimal Betamethasonbehandlung hatten keinen Effekt auf die NREM-Schlafentwicklung.

Am 106. Gestationstag (vor dem 1. Behandlungszyklus) wurde nicht zwischen REM- und NREM-Schlaf getrennt (grau hinterlegt) 2. Behandlungszyklus am 112. Gestationstag, 3. Behandlungszyklus am 118. Gestationstag; MW+SEM.

Es gab keine Unterschiede in den Ausgangswerten (Leistungsspektrum und Vorhersagefehler) am 106. Gestationstag zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Betamethasonmehrfachbehandlung (Abb. 10 bis 15).

Die erstmalige Gabe von Betamethason, in der zur Lungenreifung verwendeten Dosis, in der Mehrfachbehandlungsgruppe führte zu einem zyklischen Anstieg der spektralen Eckfrequenz am 112. Gestationstag (0,75 der Gestationsdauer) und somit 6 Tage nach der ersten Betamethasongabe, was einen sich vorzeitig entwickelnden REM-Schlaf widerspiegelt ($p < 0,05$; Abb. 10).

Nach dem 112. Gestationstag änderte sich die Eckfrequenz trotz der Wiederholungen der Betamethason Behandlung am 112. und 118. Gestationstag in der Gruppe mit mehrfacher Betamethasonbehandlung bis zum 130. Gestationstag nicht mehr. Sie entsprach damit bereits am 112. Gestationstag dem Niveau der Eckfrequenz, dass bei unbeeinflussten Feten am 130. Gestationstag erreicht wird (Abb. 10).

Der Betamethason induzierte Anstieg der Eckfrequenz im REM-Schlaf-ECoG war auf eine Abnahme der relativen spektralen Leistung im Deltaband und auf einen Anstieg der relativen spektralen Leistung im Betaband zurückzuführen ($p < 0,05$; Abb. 12).

Der Vorhersagefehler des ECoG's stieg ähnlich wie die Eckfrequenz nach dem ersten Behandlungszyklus bis zum 112. Gestationstag im Vergleich zu den Kontrolltieren an und spiegelt einen sich vorzeitig entwickelnden REM-Schlaf wider ($p < 0,05$, Abb. 14). Im Gegensatz zur spektralen Eckfrequenz war der Anstieg des Vorhersagefehlers nur transient (Abb. 14).

Durch die wiederholte Betamethasonbehandlung konnte eine Verzögerung des ontogenetisch bedingten Abfalls der Eckfrequenz (beginnend am 112. Gestationstag bei den Kontrollen und am 118. Gestationstag bei den mehrfach mit Betamethason behandelten Tieren, Abb. 11) und des Vorhersagefehlers (beginnend am 118. Gestationstag bei den Kontrollen und am 124. Gestationstag bei den wiederholt mit Betamethason behandelten Tieren, Abb. 15) im NREM-Schlaf-ECoG festgestellt werden (Abb. 11, 13 und 15).

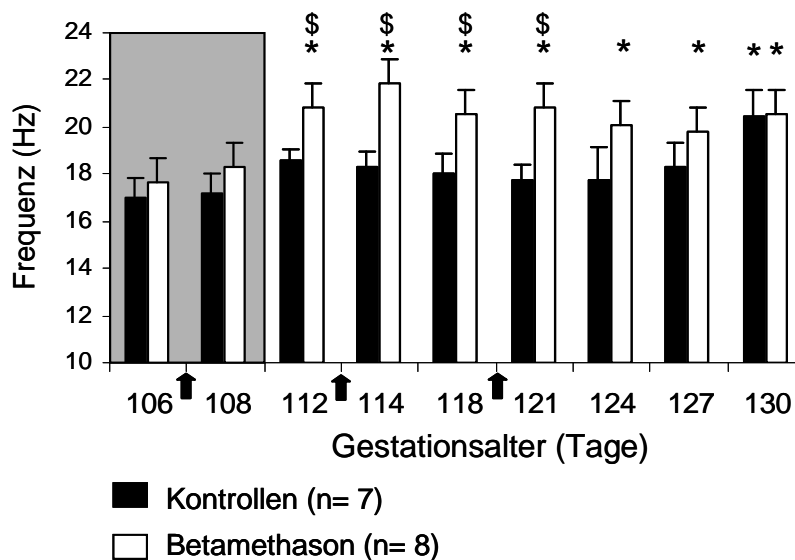


Abb. 10 Die Entwicklung der spektralen Eckfrequenz des ECoG's im REM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 130. Gestationstag in Abhängigkeit von einer mehrfachen Betamethasongabe.

Die Betamethasonbehandlung führte zu einer vollständigen Entwicklung des REM-Schlafes bis zum 112. Gestationstag. Eine Wiederholung der Behandlung hatte keine zusätzlichen Effekte.

Die Behandlungszyklen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Am 106. und 108. Gestationstag konnte mit der Spektralanalyse noch nicht zwischen einem sich entwickelnden REM- und NREM-Schlaf unterschieden werden (grau hinterlegt). MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum 106. Gestationstag; \$ $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

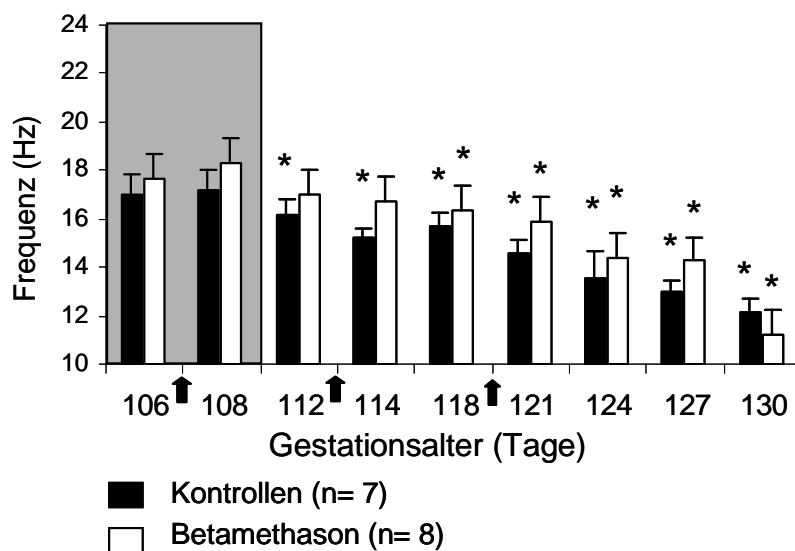


Abb. 11 Die Entwicklung der spektralen Eckfrequenz des ECoG's im NREM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 130. Gestationstag in Abhängigkeit von einer mehrfachen Betamethasongabe.

Die Behandlungszyklen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Am 106. und 108. Gestationstag konnte mit der Spektralanalyse noch nicht zwischen REM- und NREM-Schlaf getrennt werden (grau hinterlegt).

MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum 106. Gestationstag.

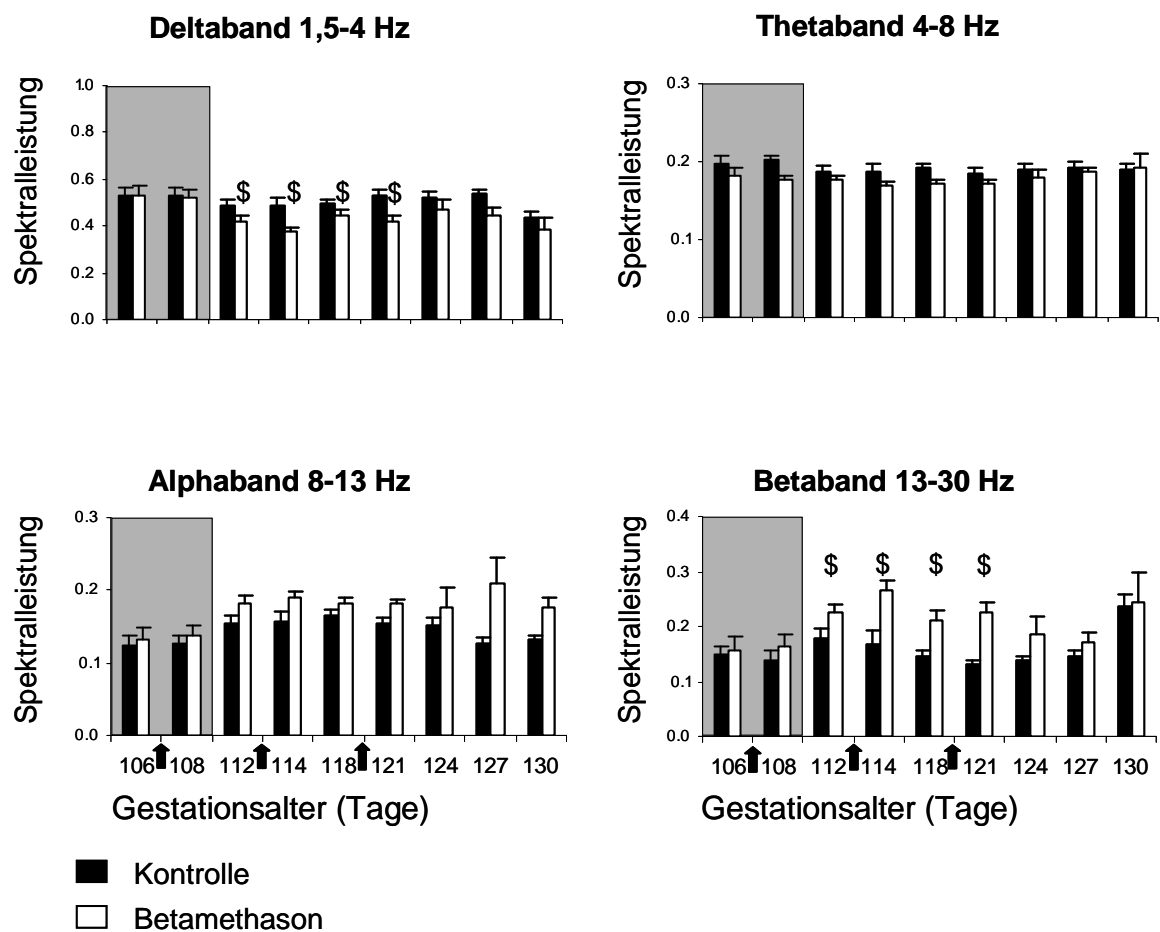


Abb. 12 Die Entwicklung der relativen spektralen Leistung des ECoG's in den einzelnen Frequenzbändern relativ zur Gesamtleistung im REM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 130. Gestationstag in Abhängigkeit von einer mehrfachen Betamethasongabe.

Die Zunahme der Eckfrequenz (Abb. 10) ist auf eine Zunahme der Leistung im Betaband zurückzuführen.

Die Behandlungszyklen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Am 106. und 108. Gestationstag wurde nicht zwischen REM- und NREM-Schlaf getrennt (grau hinterlegt). Die Gesamtleistung ergibt 1,0.

MW+SEM; \$ $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe

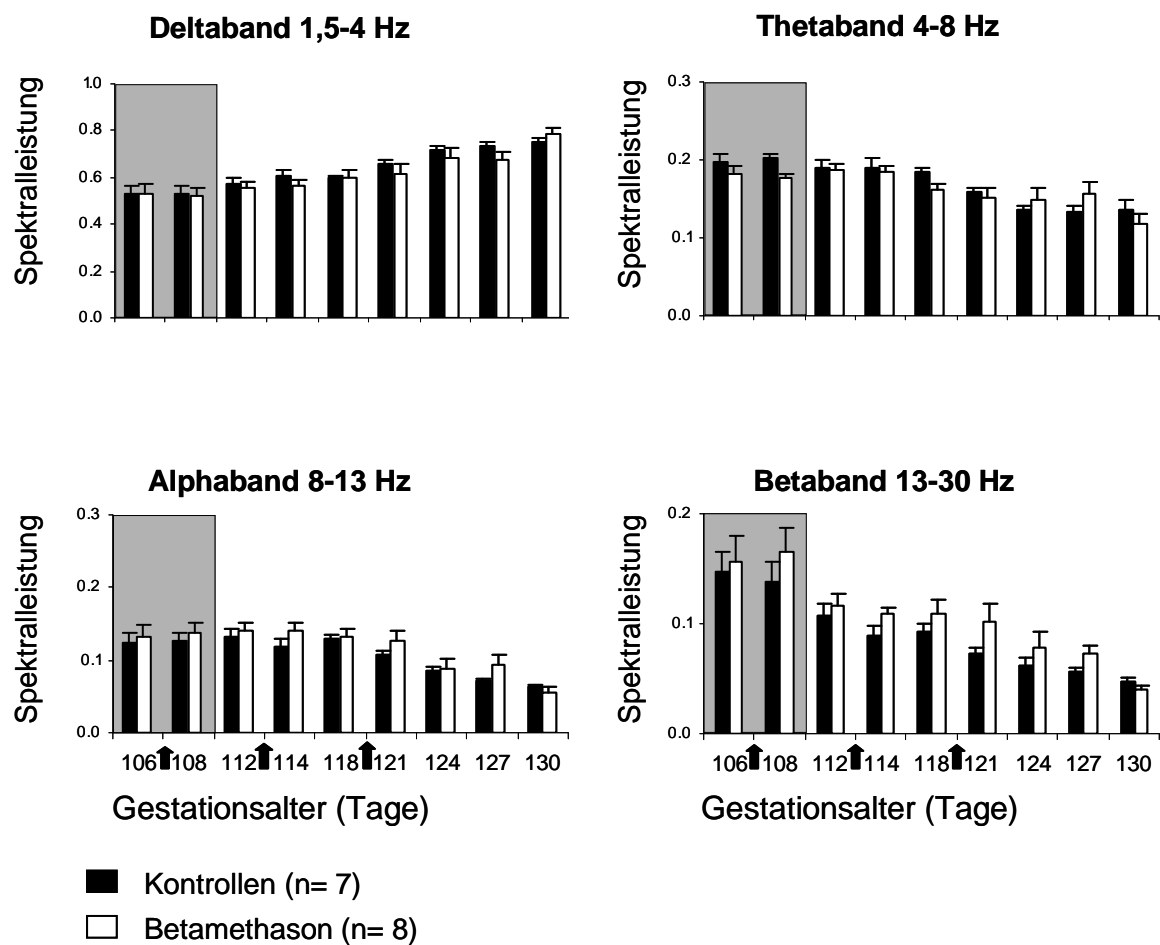


Abb. 13 Die Entwicklung der spektralen Leistung des ECoG's in den einzelnen Frequenzbändern relativ zur Gesamtleistung im NREM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 130. Gestationstag in Abhängigkeit von einer mehrfachen Betamethasongabe.

Die Behandlungszyklen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Am 106. und 108. Gestationstag wurde nicht zwischen REM- und NREM-Schlaf getrennt (grau hinterlegt). Die Gesamtleistung ergibt 1,0.

MW+SEM

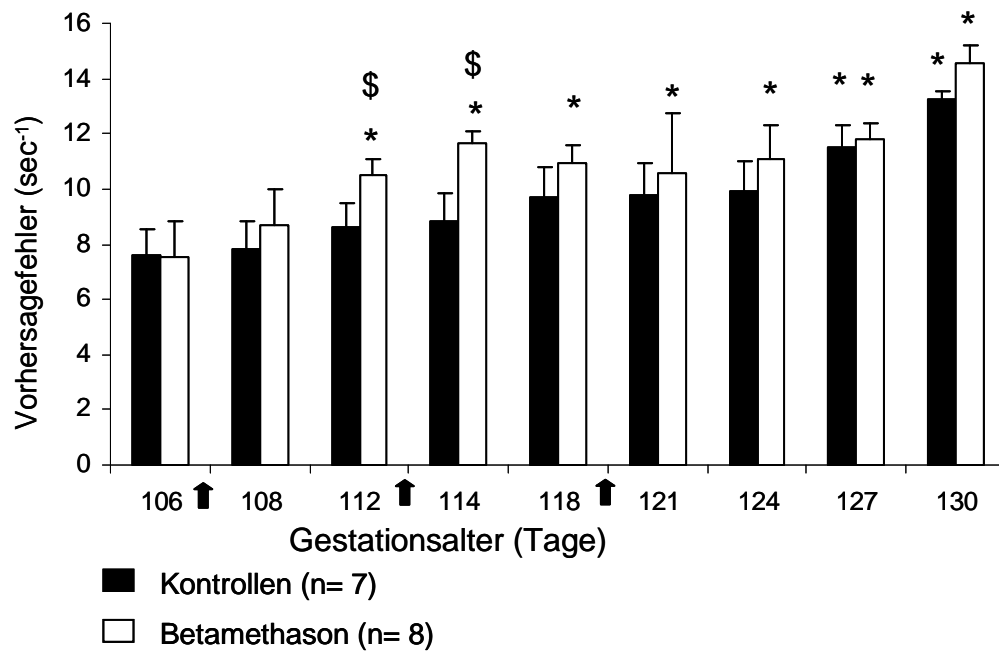


Abb. 14 Die Entwicklung des Vorhersagefehlers des ECoG's im REM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 130. Gestationstag in Abhängigkeit von einer mehrfachen Betamethasongabe.

Die Behandlungszyklen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum 106. Gestationstag; \$ $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

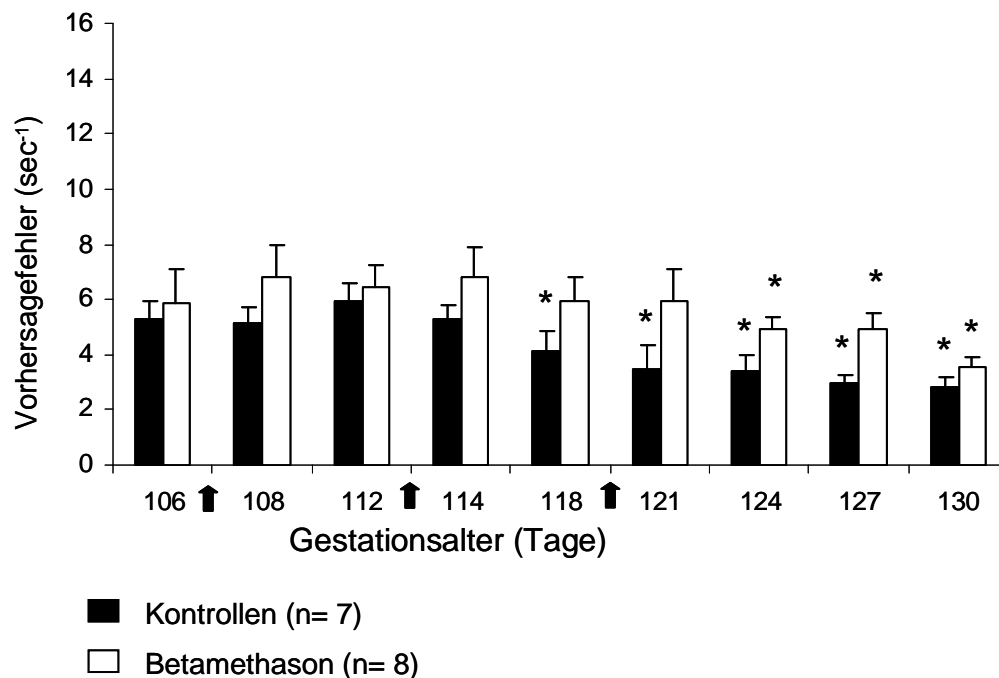


Abb. 15 Die Entwicklung des Vorhersagefehlers des ECoG's im NREM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 130. Gestationstag in Abhängigkeit von einer mehrfachen Betamethasongabe.

Die Behandlungszyklen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum 106. Gestationstag.

5.4 Akute Effekte einer pränatalen Betamethasonbehandlung

In diesem Kapitel werden die akuten Betamethasoneffekte auf die elektrokortikale Hirnaktivität beschrieben. Die nachgewiesenen chronischen Betamethasoneffekte machten akute Effekte wahrscheinlich. Das ECoG wurde deshalb vor Gabe, 2h, 6h und 18h nach den beiden Betamethasongaben, die im Rahmen jedes Behandlungszyklus im Abstand von 24h erfolgten, analysiert.

5.4.1 Erster Behandlungszyklus am 106. Gestationstag

Die Kontrolltiere zeigten während des ersten Behandlungszyklus am 106. und 107. Gestationstag eine konstante elektrokortikale Hirnaktivität (Leistungsspektrum und Vorhersagefehler, Abb. 16 bis 19).

Die Betamethasongabe während des ersten Behandlungszyklus hatte keine Änderung der elektrokortikalen Hirnaktivität (Leistungsspektrum und Vorhersagefehler) zur Folge (Abb. 16 bis 19).

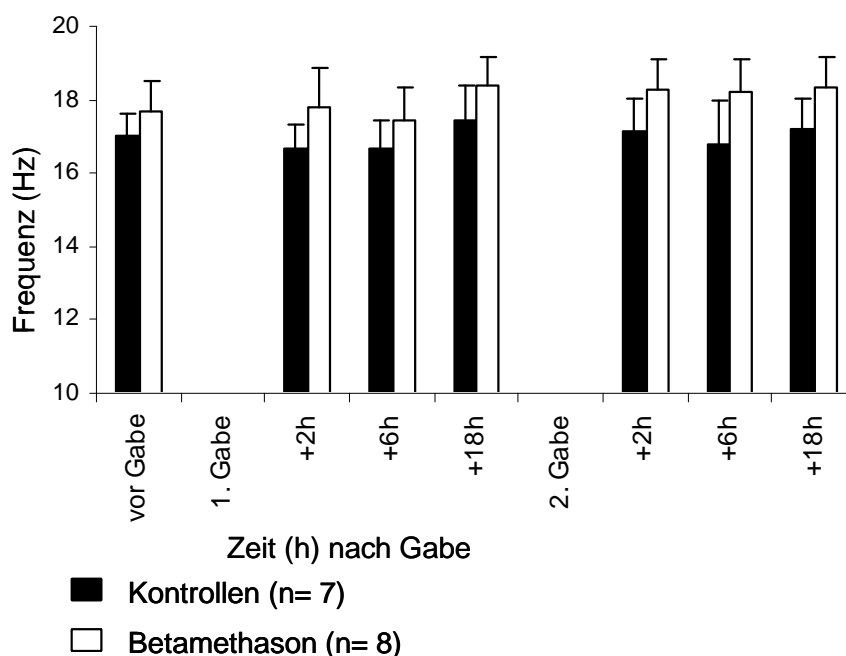


Abb. 16 Spektrale Eckfrequenz des ECoG's während des ersten Behandlungszyklus am 106. und 107. Gestationstag.

Die Spektralanalyse zeigte keine zyklische Aktivität. Eine Trennung nach Schlafstadien war mit Hilfe der Leistungsspektralanalyse noch nicht möglich.

MW+SEM

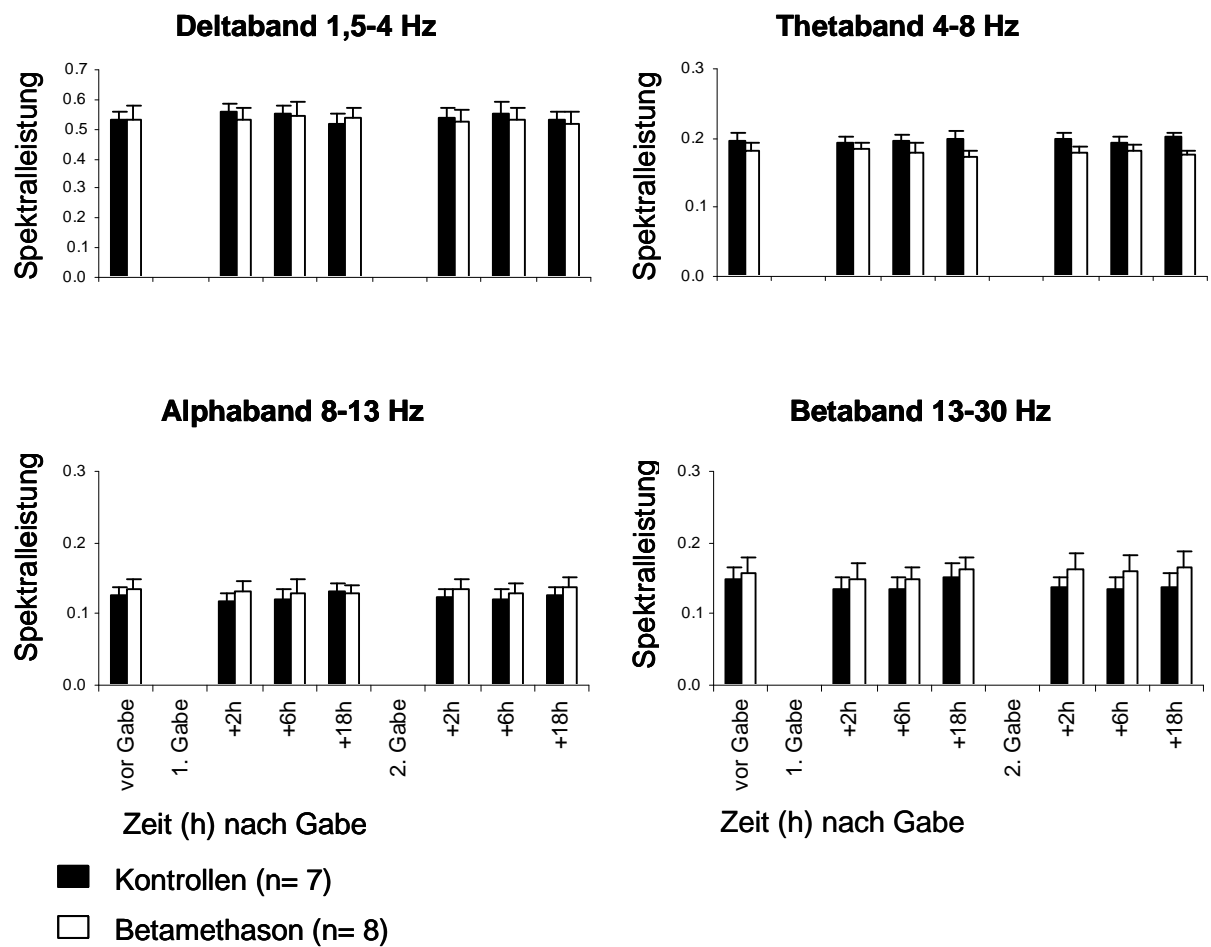


Abb. 17 Spektrale Leistung des ECoG's in den einzelnen Frequenzbändern relativ zur Gesamtleistung während des ersten Behandlungszyklus am 106. und 107. Gestationstag.

Eine Trennung nach Schlafstadien war mit Hilfe der Leistungsspektralanalyse noch nicht möglich.

MW+SEM Die Gesamtleistung ergibt 1,0.

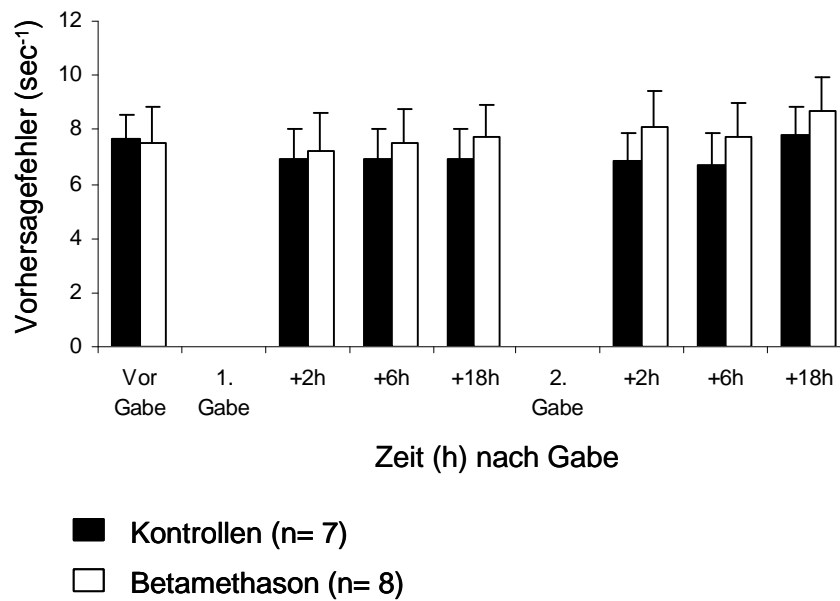


Abb. 18 Vorhersagefehler des ECoG's im REM-Schlaf-ECoG während des ersten Behandlungszyklus am 106. und 107. Gestationstag.

MW+SEM

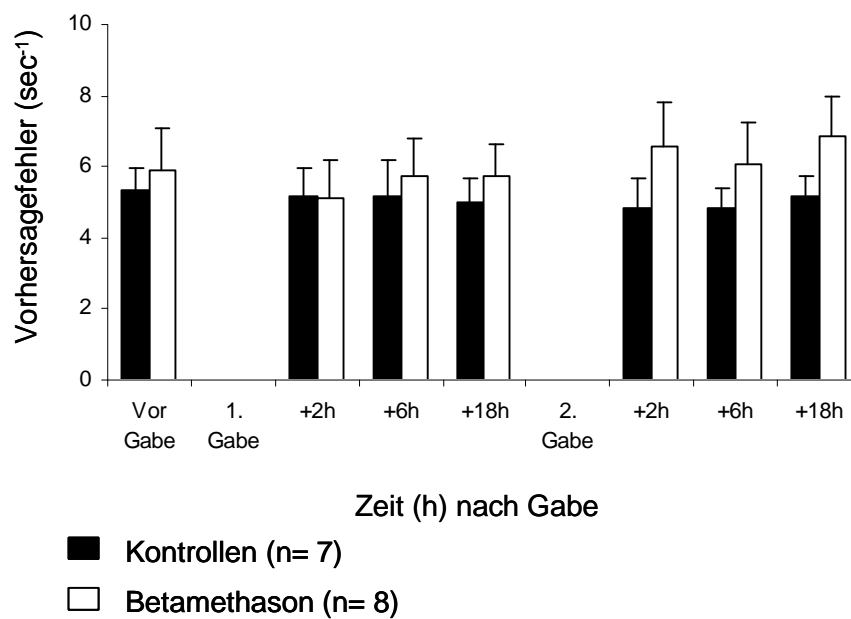


Abb. 19 Vorhersagefehler des ECoG's im NREM-Schlaf-ECoG während des ersten Behandlungszyklus am 106. und 107. Gestationstag.

MW+SEM

5.4.2 Zweiter Behandlungszyklus am 112. Gestationstag – Effekte der Vorbehandlung am 106. Gestationstag

Am 112. Gestationstag erhielten zwei Gruppen von Tieren Betamethason. Zu der Gruppe von Tieren, die am 106. Gestationstag bereits mit Betamethason behandelt wurden (Mehrfachbehandlung), kamen Tiere die am 111. Gestationstag erstmals Betamethason erhielten, um die Effekte einer Vorbehandlung mit Betamethason zu untersuchen (Einfachbehandlung).

Die Kontrolltiere zeigten keine Änderung der elektrokortikalen Hirnaktivität (Leistungsspektrum und Vorhersagefehler) im REM- und NREM-Schlaf-EECoG über den Untersuchungszeitraum vom 112. bis 114. Gestationstag (Abb. 20 – 25).

Die am 111. Gestationstag erstmalig behandelten Feten zeigten jeweils 6h nach der ersten und zweiten Betamethasongabe einen Abfall ($p < 0,05$) der spektralen Eckfrequenz im REM- und NREM-Schlaf-EECoG, welcher 18h nach Gabe nicht mehr nachweisbar war (Abb. 20 und 21). Dieser Abfall der Eckfrequenz war auf den Abfall in der relativen Leistung im Alpha- und Betaband sowie einen Anstieg im Deltaband zurückzuführen, wobei der Abfall im Alpha- und Betaband nur während der ersten Injektion signifikant wurde ($p < 0,05$; Abb. 22 und 23). Parallel zu den Änderungen im Leistungsspektrum fiel auch der Vorhersagefehler 6h nach Betamethasongabe im REM- und NREM-Schlaf-EECoG ab ($p < 0,05$; Abb. 24 und 25).

Die Eckfrequenz sowie der Vorhersagefehler waren bei den am 106. Gestationstag vorbehandelten Tieren im REM-Schlaf-EECoG schon vor der Betamethasongabe im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht ($p < 0,05$; Abb. 20 und 24). Dieser Anstieg der Eckfrequenz sowie des Vorhersagefehlers ist somit auf den ersten Behandlungszyklus am 106. Gestationstag zurückzuführen. Bei den vorbehandelten Tieren ließen sich keine akuten Betamethasoneffekte auf das Leistungsspektrum nachweisen (Abb. 20 und 22). Der Vorhersagefehler dagegen fiel im REM-Schlaf-EECoG ähnlich zu den nicht vorbehandelten Tieren jeweils 2h und 6h nach Betamethasongabe ab ($p < 0,05$; Abb. 24). Im NREM-Schlaf-EECoG konnten ein Abfall des Vorhersagefehlers nur 6h nach der ersten Injektion nachgewiesen werden ($p < 0,05$; Abb. 25).

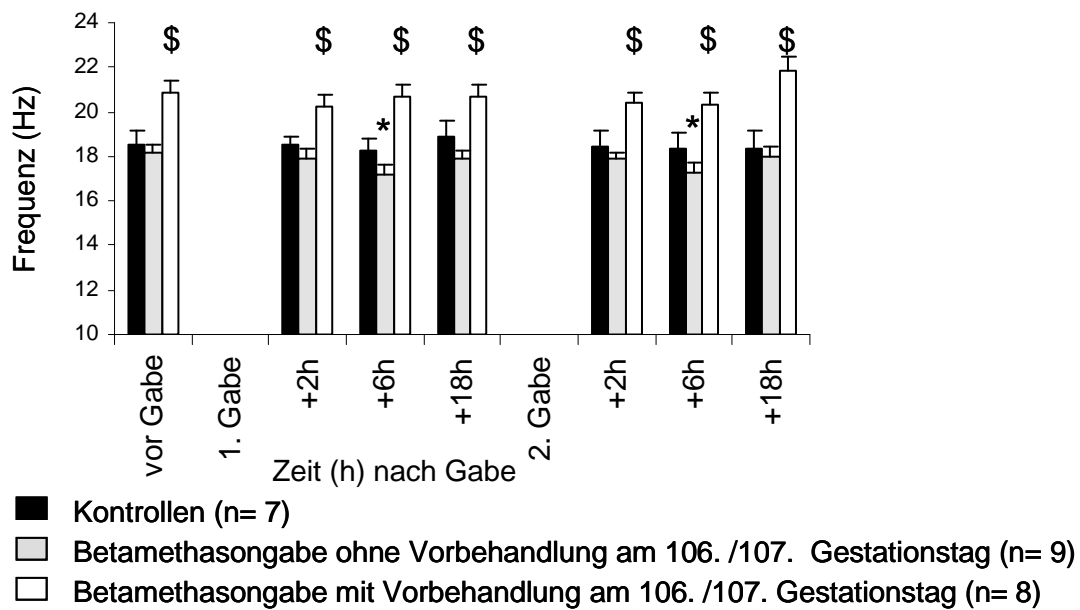


Abb. 20 Akute Effekte von Betamethason auf die spektrale Eckfrequenz des REM-Schlaf-ECoG's während des Behandlungszyklus am 112. und 113. Gestationstag in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung am 106. und 107. Gestationstag.

Die Betamethasongabe führte nur bei den Tieren ohne Vorbehandlung zu einer transienten Abnahme der Eckfrequenz. Die höhere Eckfrequenz vor der Betamethasongabe resultierte aus der Vorbehandlung am 106. und 107. Gestationstag.

MW+SEM; [§] p<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe; * p<0,05 im Vergleich zum Ausgangswert vor Betamethasongabe.

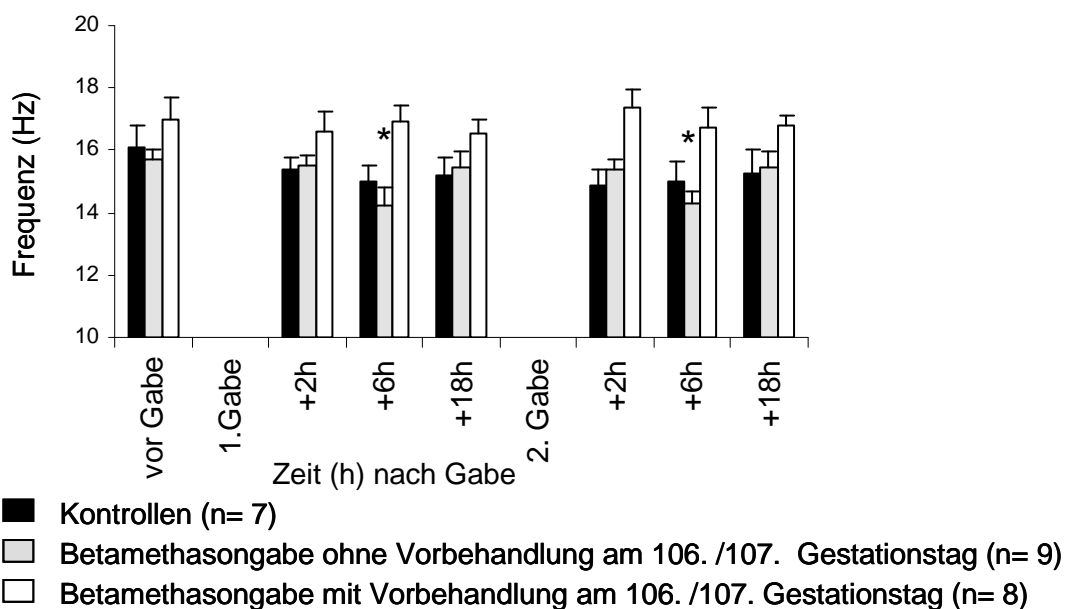


Abb. 21 Akute Effekte von Betamethason auf die spektrale Eckfrequenz des NREM-Schlaf-ECoG's während des Behandlungszyklus am 112. und 113. Gestationstag in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung am 106. und 107. Gestationstag.

Die Betamethasongabe führte nur bei den Tieren ohne Vorbehandlung zu einer transienten Abnahme der Eckfrequenz. Die höhere Eckfrequenz vor der Betamethasongabe resultierte aus der Vorbehandlung am 106. und 107. Gestationstag.

MW+SEM; * p<0,05 im Vergleich zum Ausgangswert vor Betamethasongabe.

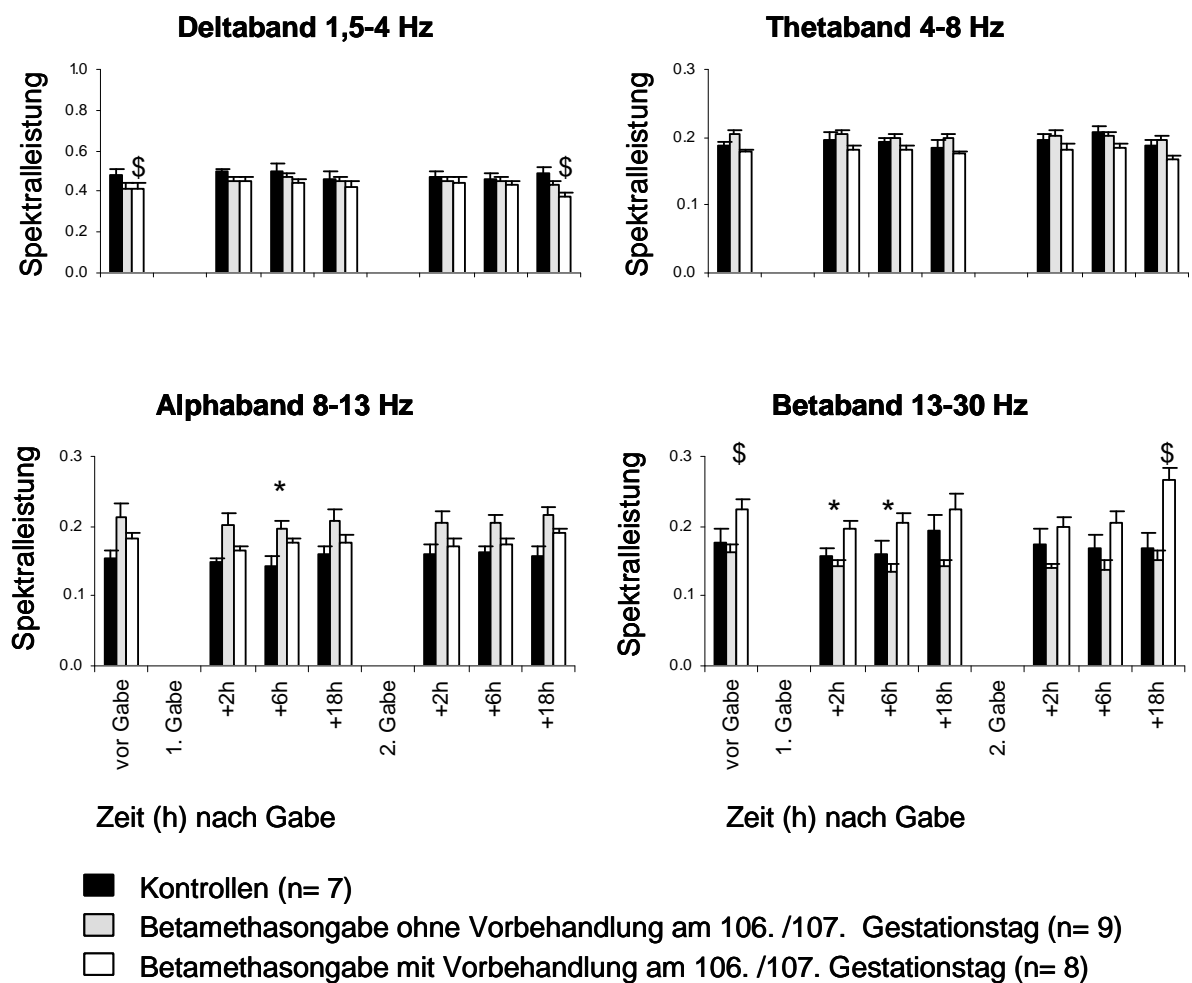


Abb. 22 Akute Effekte von Betamethason auf die spektrale Leistung des REM-Schlaf-ECoG's in den einzelnen Frequenzbändern relativ zur Gesamtleistung während des Behandlungszyklus am 112. und 113. Gestationstag in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung am 106. und 107. Gestationstag.

Die Betamethasongabe führte nur bei den Tieren ohne Vorbehandlung zu einer transienten Senkung der Leistung im Betaband nach der ersten Gabe.

Die Unterschiede in den Werten vor der Gabe resultierten aus der Betamethasonvorbehandlung am 106. Gestationstag.

MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum Ausgangswert vor Gabe; $^{\$}$ $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

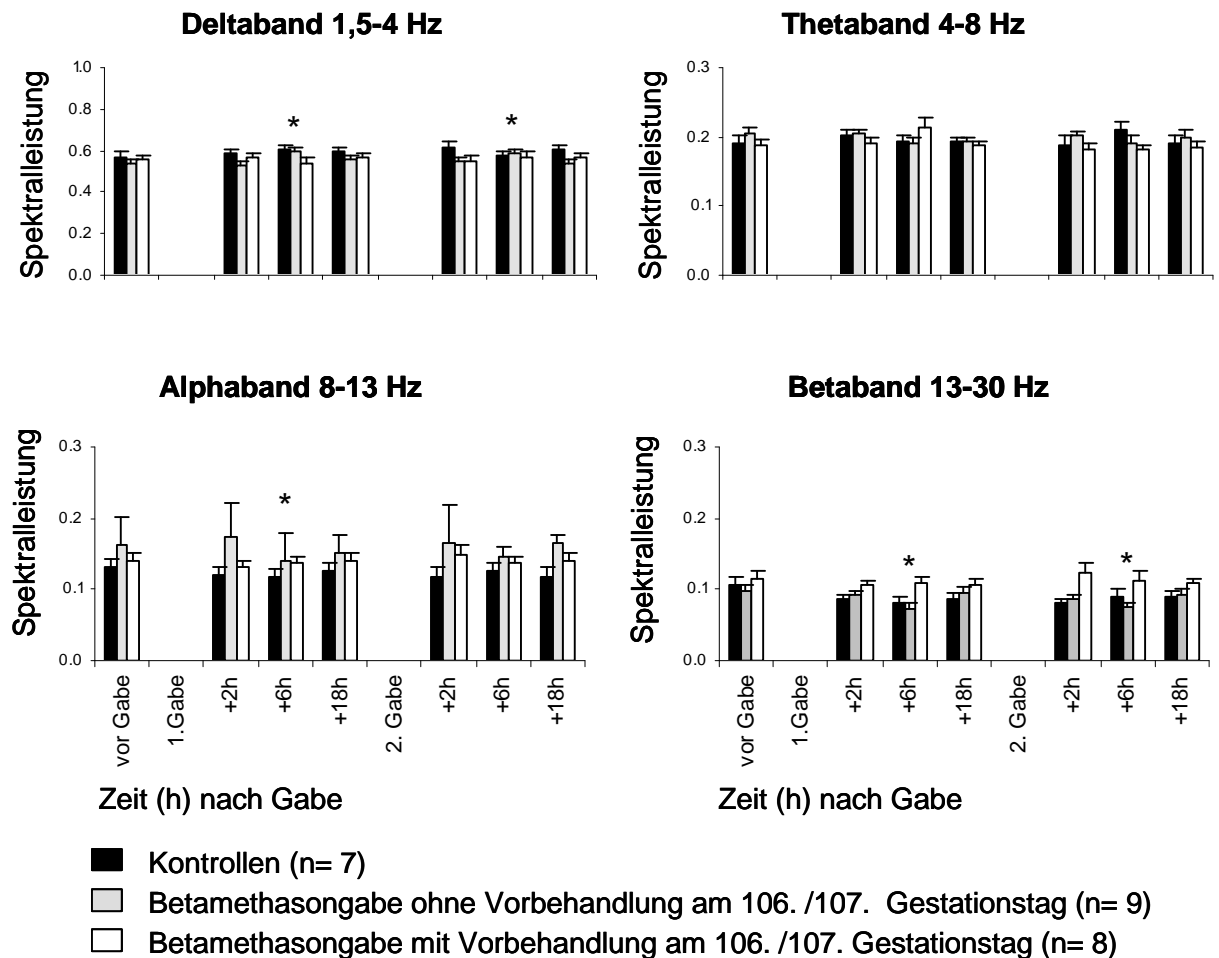


Abb. 23 Akute Effekte von Betamethason auf die spektrale Leistung des NREM-Schlaf-EEG's in den einzelnen Frequenzbändern relativ zur Gesamtleistung während des Behandlungszyklus am 112. und 113. Gestationstag in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung am 106. und 107. Gestationstag.

Die Betamethasongabe führte nur bei den Tieren ohne Vorbehandlung zu einer transienten Senkung der Leistung im Alpha und Betaband sowie zu einer Zunahme der Leistung im Deltaband.

Die Unterschiede in den Werten vor der Gabe resultierten aus der Betamethasonvorbehandlung am 106. Gestationstag.

MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum Ausgangswert vor Gabe.

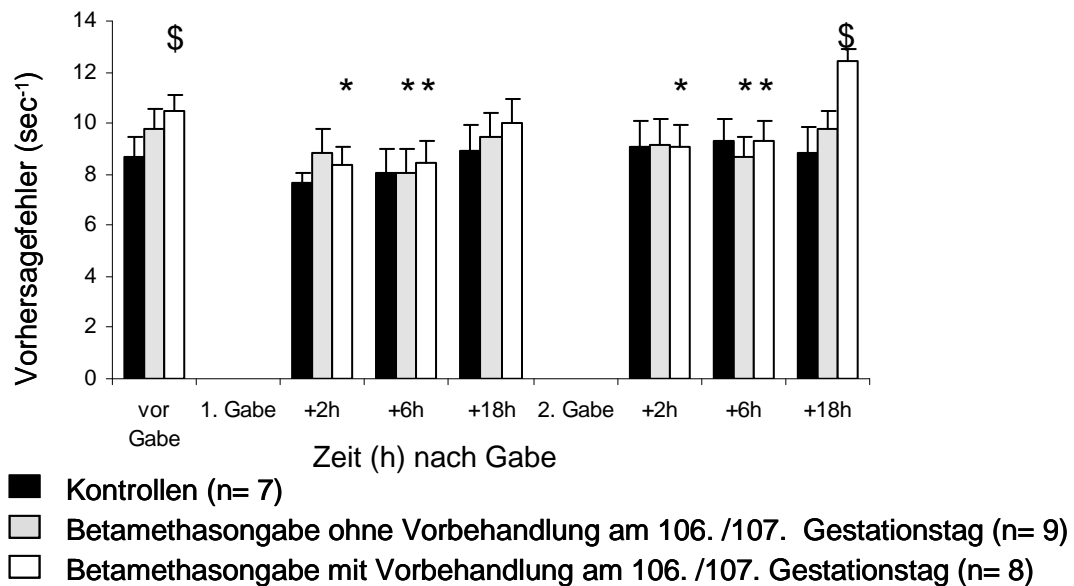


Abb. 24 Akute Effekte von Betamethason auf den Vorhersagefehler des REM-Schlaf-ECoG's während des Behandlungszyklus am 112. und 113. Gestationstag in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung am 106. und 107. Gestationstag.

Die Betamethasongabe führte unabhängig von einer Vorbehandlung zu einer transienten Abnahme des Vorhersagefehlers.

Die Unterschiede in den Ausgangswerten resultieren aus der Vorbehandlung am 106. Gestationstag.

MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum Ausgangswert vor Gabe; § $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

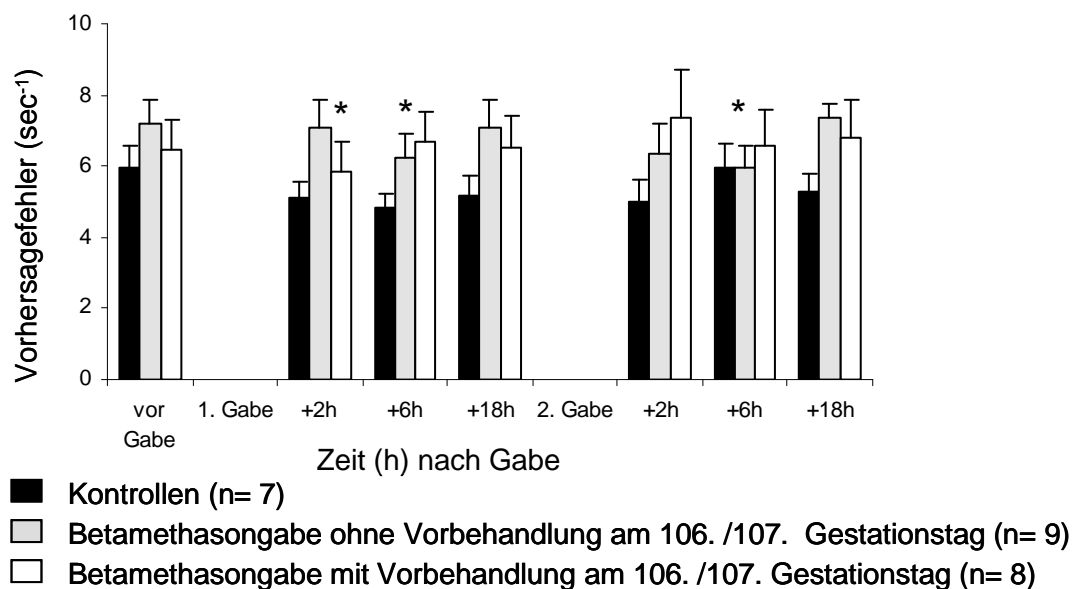


Abb. 25 Akute Effekte von Betamethason auf den Vorhersagefehler des NREM-Schlaf-ECoG's während des Behandlungszyklus am 112. und 113. Gestationstag in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung am 106. und 107. Gestationstag.

Die Betamethasongabe führte unabhängig von einer Vorbehandlung zu einer transienten Abnahme des Vorhersagefehlers.

Die Unterschiede in den Ausgangswerten resultieren aus der Vorbehandlung am 106. Gestationstag.

MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum Ausgangswert vor Gabe.

5.4.3 Dritter Behandlungszyklus am 118. Gestationstag

Bei den am 118. Gestationstag zum dritten Mal mit Betamethason behandelten Tieren zeigte sich innerhalb von 24h nach Betamethasongabe kein Effekt auf das Leistungsspektrum und den Vorhersagefehler des ECoG's. Es war auch keine Tendenz erkennbar; auf die Erhöhung der Tierzahl wurde deshalb verzichtet (Abb. 26).

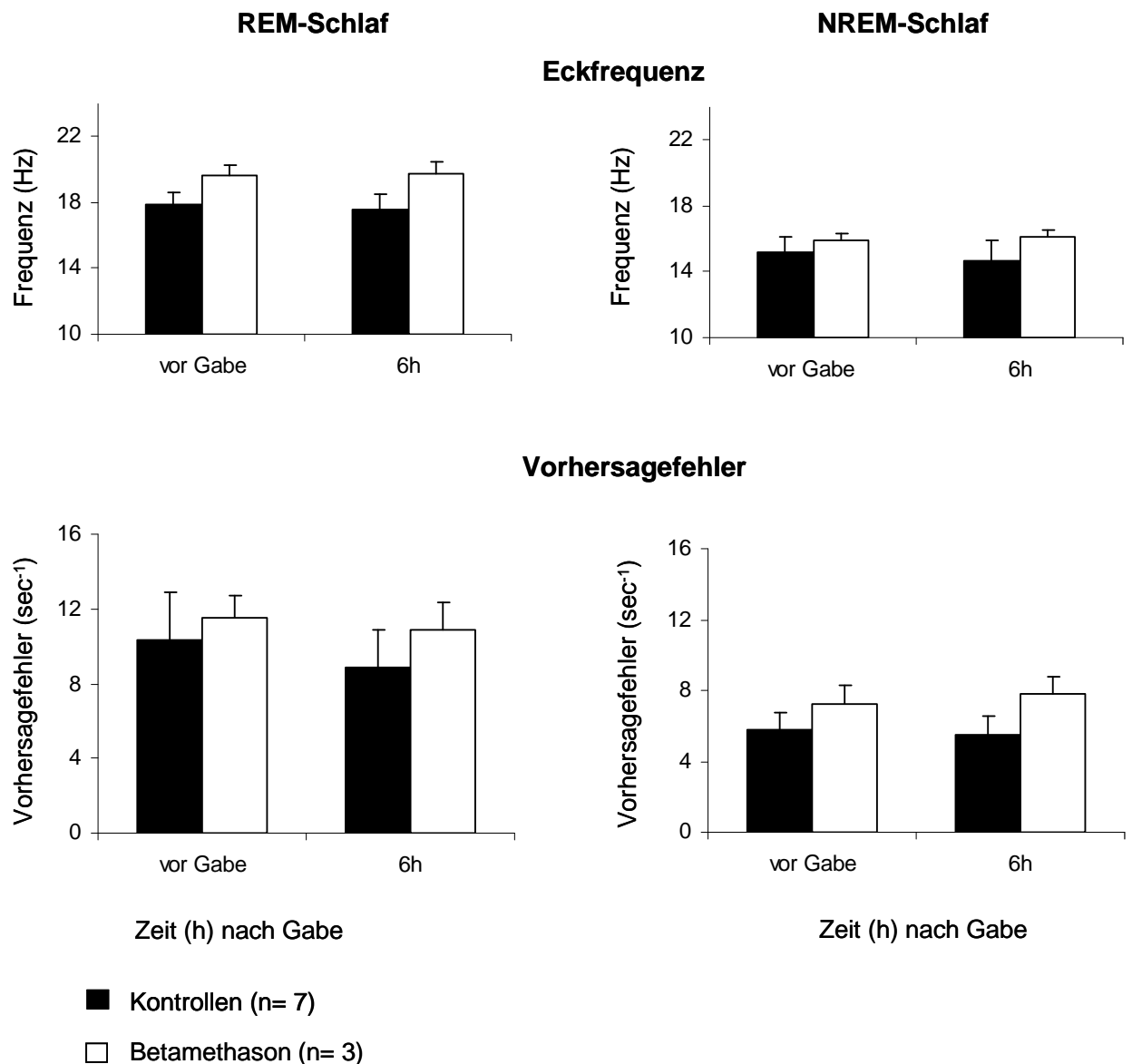


Abb. 26 Spektrale Eckfrequenz und Vorhersagefehler im REM- und NREM-Schlaf-ECoG während des dritten Behandlungszyklus am 118. Gestationstag.

MW+SEM

5.5 Einfluss von Betamethason auf die Schlafstadienlänge

5.5.1 Chronische Effekte von Betamethason auf die Schlafstadienlänge

Die Schlafstadienlänge wurde am 106. Gestationstag, d.h. vor dem ersten Behandlungszyklus, vor dem 2. Behandlungszyklus am 112. Gestationstag sowie am 130. Gestationstag über jeweils 6 Stunden vor den Betamethasongaben zwischen 24 und 6 Uhr untersucht.

Mit der Bestimmung der Schlafstadien vor dem 2. Behandlungszyklus, zu dem Zeitpunkt an dem die Effekte von Betamethason auf die Leistungsspektralanalyse und die Vorhersagbarkeit maximal waren, konnten die chronischen Effekte des erster Behandlungszyklus am 106. und 107. Gestationstag untersucht werden. Durch die Bestimmung der Schlafstadiendauer am 130. Gestationstag konnten wir auch die chronischen Effekte einer wiederholten Behandlung aufzeigen.

Am 106. Gestationstag war die Schlafstadienlänge im REM- und NREM-Schlaf-EEG deutlich kürzer als am 112. und 127. Gestationstag ($p < 0,05$; Abb. 27 und 28). Zwischen den Kontroll- und den Betamethasontieren gab es keine Unterschiede.

Die Betamethasonbehandlung am 106. / 107. Gestationstag führte zu einer geringeren ontogenetisch bedingten Zunahme der durchschnittlichen Schlafstadienlänge bis zum 112. Gestationstag im REM- und NREM-Schlaf-EEG ($p < 0,05$ im REM-Schlaf, starke Tendenz im NREM-Schlaf, Abb. 27 und 28). Die Länge der Schlafstadien nahm entwicklungsbedingt sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mehrfach mit Betamethason behandelten Feten im REM- sowie im NREM-Schlaf-EEG zwischen dem 112. und 127. Gestationstag gleichmäßig zu, so dass bei den mit Betamethason behandelten Tieren die Fragmentierung der Schlafstadien vom 112. bis zum 130. Gestationstag unverändert bestehen blieb und die zusätzlichen Betamethason Behandlungen am 112./113. und 118./119. Gestationstag zu keiner weiteren Schlafstadienfragmentierung führten ($p < 0,05$; Abb. 27 und 28).

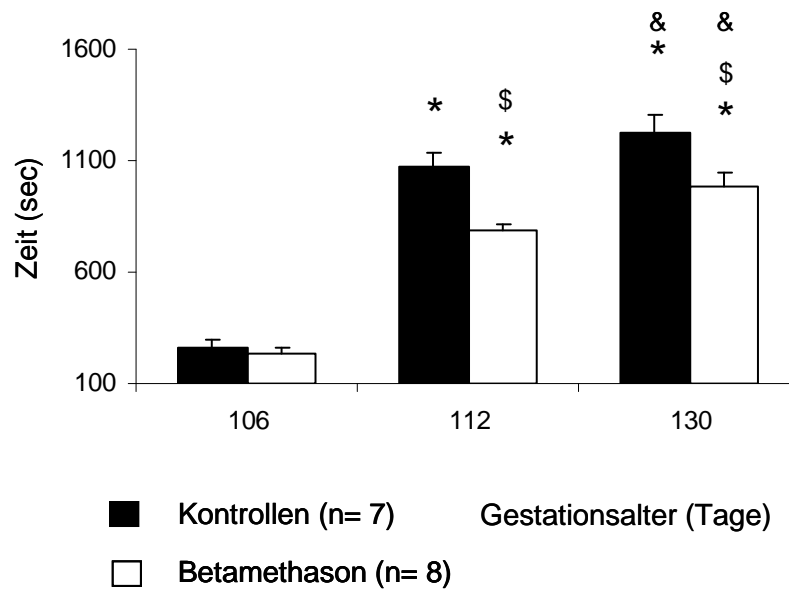


Abb. 27 Änderung der Länge der Schlafstadien im REM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 130. Gestationstag in Abhängigkeit von einer Mehrfachbehandlung mit Betamethason am 106./107., 112./123. und 118./119. Gestationstag.

Die Schlafstadienlänge wurde am 106. und 112. Tag vor der Betamethasongabe bestimmt.

Die Betamethasongabe führte zu einer dauerhaften Abnahme der Schlafstadienlänge.

MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum 106. Gestationstag; & $p < 0,05$ im Vergleich zum 112. Gestationstag; \$ $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

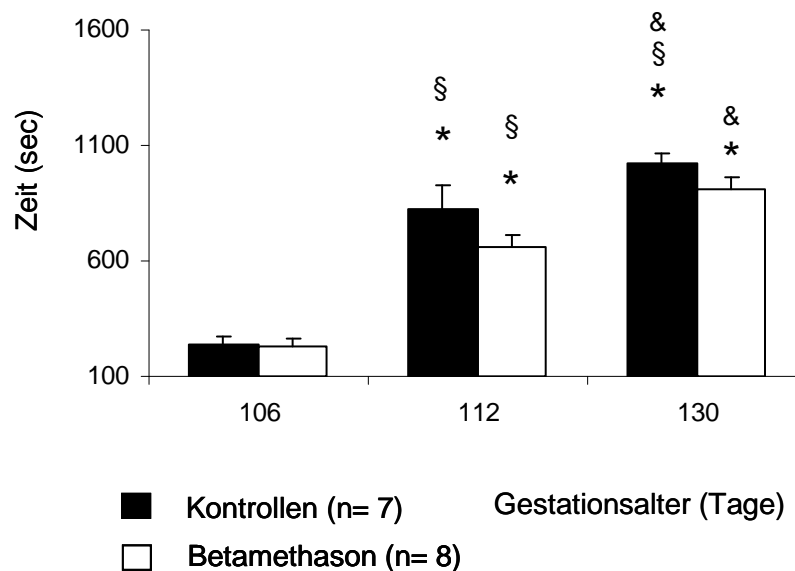


Abb. 28 Änderung der Länge der Schlafstadien im NREM-Schlaf-ECoG zwischen dem 106. und 130. Gestationstag in Abhängigkeit von einer Mehrfachbehandlung mit Betamethason am 106./107., 112./123. und 118./119. Gestationstag.

Die Betamethasongabe führte zu einer dauerhaften Abnahme der Schlafstadienlänge.

MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum 106. Gestationstag; & $p < 0,05$ im Vergleich zum 112. Gestationstag; \$ $p < 0,05$ im Vergleich zum REM-Schlaf.

5.5.2 Akute Effekte von Betamethason auf die Schlafstadienlänge

Zur Untersuchung der akuten Glukokortikoideffekte auf die Schlafstadienlänge wurde das zirkadiane Verhalten der einzelnen Schlafphasen am 111., 112. und 113. Gestationstag über jeweils 24 Stunden kontrolliert. Dadurch konnten neben den Effekten einer Erstbehandlung zusätzlich auch die chronischen Effekte einer Vorbehandlung mit Betamethason am 106./107. Gestationstag untersucht werden.

Die Kontrolltiere wiesen im REM-Schlaf-ECoG am 112. Gestationstag eine deutlich sichtbare zirkadiane Rhythmik auf. Die Schlafstadienlänge besaß ein Maximum zwischen 12 und 18 Uhr und fiel dann zwischen 18 und 24 Uhr auf ein Minimum ab. Zwischen 6 und 18 Uhr stieg die Schlafstadienlänge wieder langsam an ($p < 0,05$; Abb. 29). Im NREM-Schlaf-ECoG war keine tageszeitliche Rhythmik nachweisbar (Abb. 29).

Die Betamethasongabe, die um 12 Uhr erfolgte, zerstörte die zirkadiane Rhythmik unabhängig von einer Vorbehandlung am 106. / 107. Gestationstag (Abb. 29).

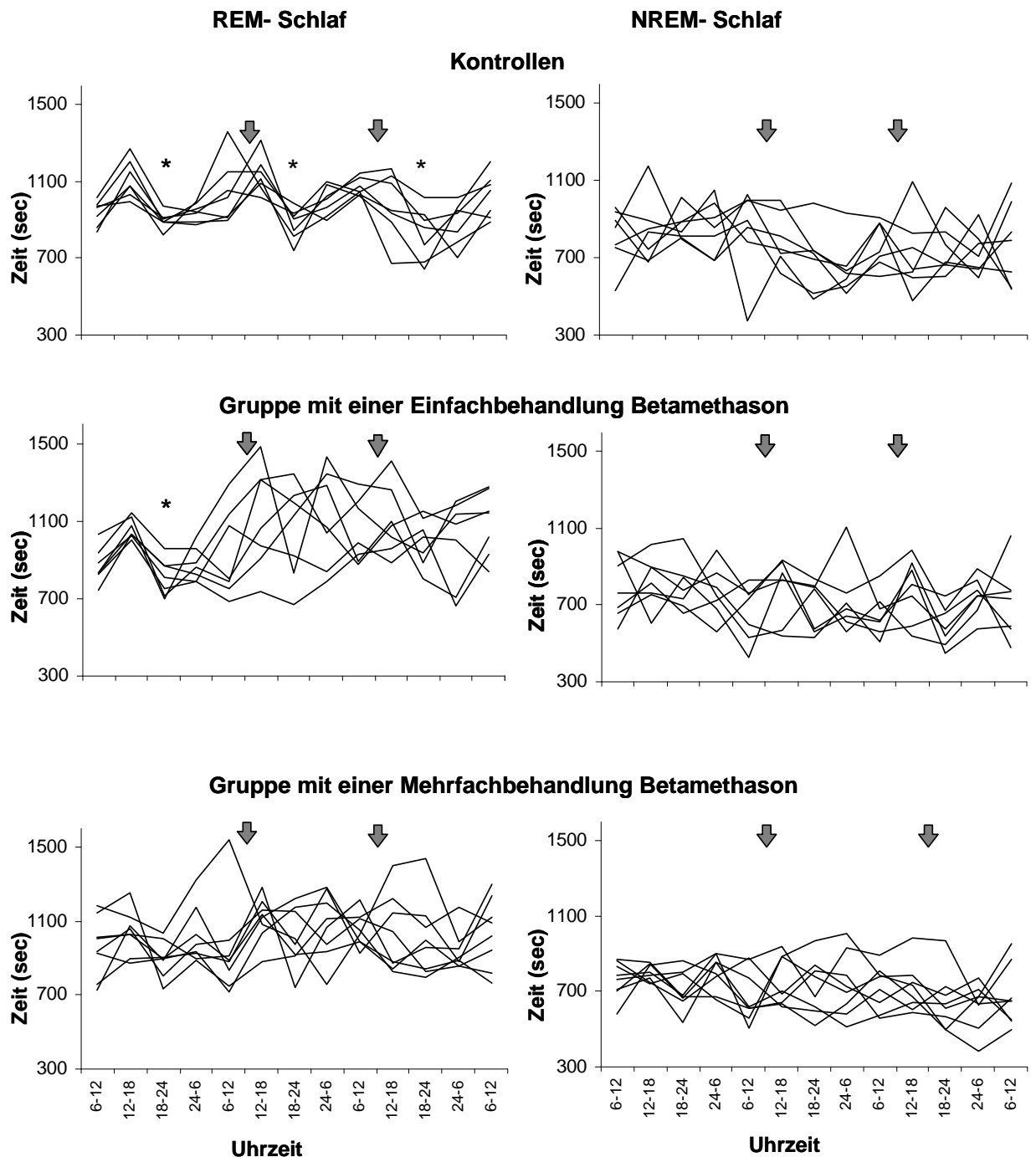


Abb. 29 Änderung der Länge der Schlafstadien während der Behandlung mit Betamethason am 112. und 113. Gestationstag in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung am 106. und 107. Gestationstag. Die Gabe von NaCl oder Betamethason erfolgte 12:00 Uhr (graue Pfeile).

Die Betamethasongabe zerstörte die tageszeitliche Rhythmik im REM-Schlaf.

n=7 in der Kontrollgruppe, n=8 in der Betamethasongruppe mit Vorbehandlung am 106. und 112. Gestationstag (Mehrfachbehandlung), n=7 in der Betamethasongruppe ohne Vorbehandlung (Einfachbehandlung); MW+SEM; * $p < 0,05$ im Vergleich zum Wert 12-18 Uhr.

6 Diskussion

6.1 Methodische Betrachtungen

6.1.1 Das fetale Schaf als tierexperimentelles Modell

Das chronisch instrumentierte fetale Schaf wird seit etwa 30 Jahren als etabliertes tierexperimentelles Modell für die menschliche Fetalperiode eingesetzt. An diesem Tiermodell fanden eine Reihe von Untersuchungen zu einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Fragestellungen sowie zur Entwicklung fetaler Verhaltensstadien statt (Clewlow et al. 1983, Ruckebusch 1972, Szeto und Hinman 1985). Liggins führte an diesem Tiermodell seine bahnbrechenden Untersuchungen zu den Glukokortikoideffekten auf die Lungenreifung durch, die als Grundlage für die Einführung der pränatalen Glukokortikoidtherapie zur Beschleunigung der Lungenreifung in der Klinik gilt (Liggins und Howie 1972). Untersuchungen am fetalen Schaf zu Kernfragestellungen haben sich immer wieder als eine solide Plattform für nachfolgende Studien an Primaten erwiesen.

Die Muttertiere tolerieren die chirurgische Instrumentierung gut. Die Größe und Robustheit der Feten erlauben, im Gegensatz zu Kleinnagern einerseits und Primatenfeten andererseits, eine umfangreiche Instrumentierung. In eigenen Voruntersuchungen konnten wir zeigen, dass schon zwei Tage postoperativ keine Einflüsse der Instrumentierung auf die fetale kortikale Hirnaktivität nachweisbar waren. Weiterhin kommen bei Schafen im allgemeinen Einlings- oder Zwillingssträchtigkeiten vor.

Die intrauterine Entwicklung des Schafes ist der des Menschen ähnlich, auch wenn zum Zeitpunkt der Geburt das Schafsgehirn einen etwas höheren Reifungsgrad als das menschliche Gehirn aufweist (Astrom 1967, Dobbing und Sands 1979).

Zahlreiche Maßnahmen wurden getroffen, damit die durchgeführten Untersuchungen direkte Einflüsse der Glukokortikoidgabe, ohne die Interaktion mit weiteren Einflüssen auf die fetale Hirnfunktion, erfassen:

Die Glukokortikoidgabe und die Untersuchung der elektrokortikale Hirnaktivität erfolgten immer zur gleichen Tageszeit, um Einflüsse der zirkadianen Rhythmik der endogenen Kortisolsynthese zu minimieren (Schmidt und Thews 1997).

Die Tiere wurden einem geregelten Hell-Dunkel-Rhythmus (14h Licht, Dunkelheit von 21 Uhr bis 7 Uhr) in den Laborräumen unterworfen. Da bei Schafen die zirkadiane Rhythmik auch von der Fütterung abhängig ist, erfolgte eine regelmäßige Fütterung (Simonetta et al. 1991).

Die ECoG-Analyse wurde während Uteruskontraktionen vermieden, da die Uteruskontraktionen mit einem Abfall des arteriellen pO_2 , mit Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen sowie Änderungen in der elektrokortikalen Aktivität bis hin zu Schlafstadienänderungen einhergehen (Nathanielsz et al. 1980, Shinozuka und Nathanielsz 1998).

6.1.2 ECoG-Analyse

Das ECoG wurde parietal und frontal abgeleitet. Die parietale ECoG-Ableitung ist weniger artefaktanfällig als die frontale Ableitung und wurde aus diesem Grunde für die Auswertung ausgewählt. Die typischen Ableitpunkte entsprachen dabei den Elektrodenpositionen p3 und p4 im 10/20 System.

Die Leistungsspektralanalyse ist eine seit langem etablierte Methode zur Beurteilung der elektrokortikalen Hirnaktivität. Sie beschreibt den Frequenzinhalt des Signals, kann aber keine Auskunft über die Komplexität der neuronalen Erregung geben. Der zerebrale Kortex besteht aus etwa 10^{10} Neuronen, die zu einem komplexen Netzwerk verbunden sind und deren koordinierte Aktivität die höheren kortikalen Leistungen erst ermöglichen (Guyton 1987). Durch diese komplizierte Verschaltung der einzelnen Neuronen ist das ECoG ein hochkomplexes Signal das Informationen enthält, die nicht mit linearen Methoden beschrieben werden können (Micheloyannis et al. 1998b, Palus 1996, Pritchard et al. 1995, Theiler und Rapp 1996). Die von uns in der durchgeführten Untersuchung genutzten nichtlinearen ECoG-Analyseverfahren können Aussagen über die Komplexität des ECoG's treffen. Die im Vorfeld durchgeführten Tests auf Nichtlinearität zeigten erwartungsgemäß, dass das fetale ECoG im Zeitverlauf weder die Überlagerung eines linearen Prozesses mit Nichtstationaritäten, noch ein rein stochastischer Prozess ist. Das fetale ECoG enthält vielmehr deterministische und nichtlineare Anteile. Insbesondere das ECoG im REM-Schlaf zeichnete sich durch einen hohen Anteil an nichtlinearen Strukturen aus.

Im menschlichen EEG wurden Veränderungen nichtlinearer Parameter wie die der Korrelationsdimension, der Kolmogorowentropie, des führenden Ljapunowexponenten oder der Mutualdimension unter physiologischen Bedingungen wie kognitiver Belastung (Micheloyannis et al. 1998a), emotionaler Anspannung (Aftanas et al. 1998, Jeong et al. 1997) oder bei neurologischen Erkrankungen wie der Schizophrenie (Röschke et al. 1994), der Epilepsie (Sarnthein et al. 1998, Stam et al. 1998), dem Morbus Alzheimer (Jeong et al. 1998) und der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (Stam et al. 1997) nachgewiesen.

Die Zuordnung der ECoG-Abschnitte zu den fetalen Schlafstadien konnte ab dem 118. Gestationstag sicher durch die visuelle Analyse des ECoG's getroffen werden. Ab dem 106. Gestationstag ermöglichte die nichtlineare Analyse und ab dem 112. Gestationstag die spektrale Eckfrequenz den Nachweis einer beginnenden zyklischen ECoG-Aktivität. Die Zuordnung durch Vorhersagefehler und Eckfrequenz stimmte ab dem 118. Gestationstag mit den visuell bestimmten Schlafstadien überein, so dass man davon ausgehen kann, dass die Zuordnung zu den fetalen Schlafstadien durch oben genannte Verfahren auch vor der visuellen Unterscheidung sicher möglich war. Die Aufzeichnung der mit den fetalen Schlafstadien assoziierten Augenbewegungen und der phasischen motorischen Aktivität der Haltemuskulatur in Vorversuchen konnte die Zuordnung zu den Schlafstadien nicht verbessern. Auf eine Aufzeichnung dieser Parameter wurde zur Operationszeitverkürzung verzichtet. Das Uterus-EMG ermöglichte die sichere Detektion von Uteruskontraktionen (Shinozuka und Nathanielsz 1998), während derer eine ECoG-Auswertung nicht durchgeführt wurde.

6.2 Ergebnisdiskussion

6.2.1 Die Ontogenese der elektrokortikalen Hirnfunktion

Unsere Ergebnisse zeigen NREM- und REM-Schlafphasen, welche sich aus einem unreifen ECoG entwickelten und sich dabei klar vom sich entwickelnden REM-Schlaf-ECoG unterscheiden. Damit stehen unsere Ergebnisse im Widerspruch zu den Vermutungen, dass sich die Schlafphasen aus einer unreifen Form des REM-Schlafes entwickeln (Jouvet-Mounier et al. 1970, Shimizu und Himwich 1968, Mirmiran et al. 2003b). Diese Vermutungen gründeten sich aus dem scheinbar hohen REM-Schlafanteil nach der Geburt, der über das gesamte Leben abnimmt (Roffwarg et al. 1966) und aus der visuellen Ähnlichkeit des unreifen ECoG's mit dem REM-Schlaf-ECoG. Wir konnten vielmehr

zeigen, dass im Verlauf der Entwicklung der Hirnfunktionen die Reifung des NREM-Schlaf-ECoG's der Reifung des REM-Schlaf-ECoG's vorausgeht. Zu Beginn lag nur ein undifferenziertes Schlafmuster vor. Aus diesem begann die Reifung von NREM-Schlafmustern im ECoG am 112. Gestationstag entsprechend 0,8 der Gestation und war damit eng an die Herausbildung von geordneten Verhaltensstadien, einschließlich dem regelmäßigen Auftreten von schnellen Augenbewegungen, Skelettmuskel- und Atembewegungen zwischen dem 115. und 120. Gestationstag beim fetalen Schaf gekoppelt (Szeto und Hinman 1985). Die Reifung des niedrigamplitudigen, hochfrequenten REM-Schlaf-ECoG's begann erst viel später am 130. Gestationstag entsprechend 0,9 der Gestation, d.h. zwischen dem 112. und 130. Gestationstag wechselte die elektrokorticale Hirntätigkeit zwischen einem sich entwickelnden NREM-Schlaf-ECoG und einem unreifen, undifferenzierten ECoG-Muster. Ab dem 130. Gestationstag gab es einen Wechsel zwischen dem sich entwickelnden NREM- und REM-Schlaf. Das NREM- und REM-Schlaf-ECoG differenzierte sich nach deren Entstehung mit voranschreitendem Gestationsalter weiter. Dies spiegelte sich sowohl in der Entwicklung des Frequenzinhaltes als auch der Vorhersagbarkeit des ECoG's wider. Als Zeichen einer kontinuierlichen Entwicklung der Hirnfunktion nach Entstehung der Schlafstadien nahm die spektrale Eckfrequenz im sich entwickelnden NREM-Schlaf-ECoG ab, während die Vorhersagbarkeit stetig anstieg. Dem entsprechend stieg nach der Entstehung der Schlafstadien im sich entwickelnden REM-Schlaf-ECoG die Eckfrequenz kontinuierlich an und die Vorhersagbarkeit fiel ab.

Als Basis unserer Untersuchungen über die fetale Entwicklung der elektrokortikalen Hirnaktivität diente die Theorie, dass das ECoG ein komplexes und mehrdimensionales Signal ist (Übersicht in Stam 2005, Pritchard et al. 1995, Theiler und Rapp 1996, Micheloyannis et al. 1998b), welches nicht komplett durch lineare Verfahren beschrieben werden kann. In der Tat konnten am 106. Gestationstag, d.h. zu einem Zeitpunkt wo selbst in der spektralen Eckfrequenz als einem empfindlichen Parameter für Änderungen der Frequenzinhalte des ECoG's (Szeto und Hinman 1985) noch keine zyklische ECoG-Aktivität festzustellen war, mit Hilfe des Vorhersagefehlers verschiedene Stadien von ECoG-Aktivitäten differenziert werden. Daher sind nichtlineare Eigenschaften der elektrokortikalen Aktivität ein sensibler Marker der elektrokortikalen Entwicklung. Es ist dabei nicht klar, ob das einzelne neuronale Entladungsmuster nichtlinear ist oder ob es die Summierung dieser Entladungsmuster ist, die einen nichtlinearen Prozess ergeben.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich das unreife Schlaf-ECoG deutlich vom späteren REM-Schlaf-ECoG unterscheidet. Damit ist die Theorie, dass unreifer Schlaf REM-Schlaf ist,

nicht richtig (siehe oben). Das unreife Schlaf-ECoG unterscheidet sich jedoch genauso stark in Frequenzinhalt und nichtlinearen Eigenschaften vom reifen REM- wie vom NREM-Schlaf-ECoG. So existiert im unreifen, undifferenzierten ECoG nicht der hohe Anteil an Betaaktivität wie im REM-Schlaf-ECoG und die Vorhersagbarkeit ist im Vergleich zum REM-Schlaf-ECoG höher. Verglichen mit dem NREM-Schlaf-ECoG fehlt dem unreifen ECoG die synchronisierte Deltaaktivität, welche im thalamokortikalen Netzwerk generiert wird. Nichtsdestoweniger zeigt bereits das unreife Schlaf-ECoG zyklische Änderungen der nichtlinearen Eigenschaften. Diese unreife zyklische Aktivität kann die spontane fetale Verhaltensaktivität, wie sie bei menschlichen Feten ab der 32. SSW beobachtet wird, und den Wechsel zwischen aktivem und ruhigem Schlafverhalten bei Ratten vor der Entwicklung von REM- und NREM-Schlaf erklären (Frank und Heller 1997, Frank und Heller 2003). Andere Autoren nehmen allerdings an, dass die spontanen fetalen Verhaltensaktivitäten durch autonome motorische Aktivität und nicht durch zentrale Schlafgeneratoren verursacht werden (Corner 1985). Allerdings steht die autonome motorische Aktivität unter der Kontrolle von Neuronen des Hirnstammes, wo auch die zentralen Schlafgeneratoren sitzen und wird mit diesen synchronisiert.

Da neben dem ECoG keine Verhaltensparameter aufgezeichnet wurden, konnten wir nicht nachweisen, ob die inkompletten Änderungen der die Verhaltensstadien definierenden Verhaltensparameter (z.B. Muskeltonus, Augenbewegungen), die während der frühen menschlichen Entwicklung gesehen wurden (Okai et al. 1992, Lombroso 2004, Borghese et al. 1995, Scher et al. 2005, Dreyfus-Brisac 1975, Curzi Dascalova et al. 1993, Nijhuis et al. 1982), mit dem instabilen Wechsel der unreifen ECoG-Aktivität vor der Entwicklung zyklischer hirnelektrischer Aktivität einhergehen oder ob sie das Korrelat zyklischer Änderungen der Hirnaktivität zwischen dem sich entwickelnden NREM-Schlaf und dem unreifen Schlaf sind. Obwohl die Reifung der zyklischen Hirnaktivität nicht unbedingt mit der Entwicklung anderer Verhaltensparameter einhergehen muss, ist ein Zusammenhang wahrscheinlich, da die zyklische ECoG-Aktivität zur gleichen Zeit wie die Verhaltensstadien beim Menschen und Schaf (Szeto et al. 1985) zu reifen beginnt (Arabin und Riedewald 1992, Curzi-Dascalova et al. 1988, Curzi Dascalova et al. 1993, Nijhuis et al. 1982, Okai et al. 1992, Prechtl 1985, Hamburger 1975). Beim unreifen fetalen Schaf zum Beispiel werden EEG- und Atemmuster von unterschiedlichen Taktgebern generiert (Parkes 1992). Im Laufe der Entwicklung werden diese unabhängigen Oszillationen in Abhängigkeit von den Schlafstadien synchronisiert (Corner 1985, Hoppenbrouwers und Sterman 1975). Diese Synchronisation tritt in zeitlicher Nähe zur EEG-Differenzierung auf.

Die Annahme, dass unreifer Schlaf REM-Schlaf darstellt (Jouvet-Mounier et al. 1970, Shimizu und Himwich 1968), und sich damit REM-Schlaf schneller und zeitiger entwickelt als NREM-Schlaf, führte zur Beschreibung von bis zu 90% REM-Schlaf unmittelbar nach der Geburt (Jouvet-Mounier et al. 1970, Roffwarg et al. 1966). Der scheinbare hohe Anteil von REM-Schlaf beeinflusste mehrer Hypothesen über die Funktion von REM-Schlaf, die insbesondere den REM-Schlaf als unspezifische zerebrale Stimulation und damit wesentlich für die Funktion der Hirnentwicklung und insbesondere der Synaptogenese ansahen (Mirmiran et al. 1981, Roffwarg et al. 1966). Unser Nachweis, dass sich die Schlafstadien aus einem undifferenzierten Schlafstadium entwickeln, welches weder REM- noch NREM-Schlaf entspricht, steht in Übereinstimmung zu den Vermutungen von Frank und Heller (Frank und Heller 2003), die bei neonatalen Ratten (Ratten sind postnatale Hirnentwickler) postulierten, dass sich REM- und NREM-Schlaf aus undifferenzierten Stadien mit nichtsynchronisierten Verhaltensparametern, welche weder unreifen REM- noch NREM-Schlaf entsprechen, entwickeln (Frank und Heller 1997). Diesen Stadien könnten die frühen unspezifischen Schlafphasen mit zyklischen Änderungen der Vorhersagbarkeit in unseren Untersuchungen entsprechen.

Die späte Entwicklung des REM-Schlafes steht in Übereinstimmung mit früheren Befunden, die an Ratten zeigten, dass charakteristische Eigenschaften des REM-Schlafes wie die hippokampale Theta Aktivität (Frank und Heller 2003), PGO- (ponto-geniculo-occipitale) Wellen (Bowe-Anders et al. 1974), die Unterdrückung der Willkürmotorik (Chase 1971, Iwamura et al. 1968) und die homeostatische Regulation (Feng et al. 2001) sich über einen langen Zeitraum bis weit postnatal entwickeln. Der Beginn der zyklischen ECoG-Aktivität mit der Entwicklung des NREM-Schlaf-ECoG's unterstreicht, dass die Entwicklung der synchronisierten Deltaaktivität ein wichtiger Schritt in der Funktionsentwicklung des Gehirns ist. Während des NREM-Schlafes wird die kortikale neuronale Aktivität durch die Aktivität des Thalamus, welcher seinerseits unter der Kontrolle des mesenzephalo-retikularen Systems steht, gesteuert (Überblick in McCormick und Bal 1997). Die Interaktion der kortikalen und thalamischen Systeme führt zu einem koordinierten Auftreten kortiko-thalamokortikaler Rhythmen, welche sich mit slow waves (< 1 Hz), Deltawellen (1.5 – 4 Hz) und Spindel Aktivität (7 – 14 Hz) im ECoG darstellen (Überblick in Steriade et al. 1993, Steriade et al. 1994, McCormick und Bal 1997). Die Synchronisation und hohe Vorhersagbarkeit des ECoG's während des NREM-Schlafes deuten auf eine sehr regelmäßige thalamische Schrittmacheraktivität hin. Der Verlust von Irregularitäten und die steigende Dominanz der synchronisierten Deltaaktivität führten zu einer Steigerung der Vorhersagbarkeit und der Deltaaktivität im sich entwickelnden NREM-Schlaf, was

wahrscheinlich auf die Reifung der thalamokortikalen Schrittmacherzentren zurückzuführen ist. Die scheinbar frühere Entwicklung des ECoG-Frequenzspektrums (Abb. 6) als die des Vorhersagefehlers (Abb. 5) im NREM-Schlaf-ECoG war technisch verursacht. Die entwicklungsbedingten Änderungen wurden mit dem 106. Tag verglichen, an dem der Vorhersagefehler im Gegensatz zum ECoG-Frequenzspektrum schon zyklische Aktivität zeigte.

Während des REM-Schlafes führt der tonische Einfluss von exitatorischen Impulsen aus dem Hirnstamm ins Vorderhirn zu einer Suppression von verschiedenen langsamen thalamokortikalen Rhythmen (Überblick in McCormick und Bal 1997, Steriade und McCarley 1990). Der Anstieg der Komplexität im REM-Schlaf-ECoG, welcher sich als ein Ausdruck der Reifung im Abfall der Vorhersagbarkeit zeigt, kann als eine Beteiligung von Neuronen an der Signalverarbeitung von differenzierteren Aufgaben, d.h. jedes Neuron feuert mit einem eigenen Muster, verstanden werden. Auch der Anstieg der Betaaktivität im REM-Schlaf mit steigendem Gestationsalter stimmt mit dieser Theorie überein. Ebenso wird beim Menschen im Allgemeinen ein Anstieg der Betaaktivität während kognitiver Aufgaben, die einen höheren Grad an Informationsverarbeitung benötigen, beobachtet (Niedermeyer 2004).

Der REM-Schlaf wird von cholinergen Neuronen in der medullären *Formatio reticularis* und dem dorsalen pontinen Tegmentum generiert und durch pontine Strukturen vermittelt. Die Reifung der komplexen pontomedularen neuronalen Verschaltungen und der aufsteigenden cholinergen Bahnen zum thalamokortikalen System ist für die Induktion von REM-Schlaf wichtig (McCormick und Pape 1988, Francesconi et al. 1988). In Anbetracht der Wichtigkeit des cholinergen Systems in der Generierung und Aufrechterhaltung von REM-Schlaf (McGinty und Drucker-Colin 1982), kann man erwarten, dass die Entwicklung dieses neuromodulatorischen Systems entscheidend für die Entwicklung des REM-Schlafes ist. In der Tat ist das cholinerge System in der neugeborenen Ratte vor der Entwicklung des REM-Schlafes extrem unreif (Coyle und Yamamura 1976). Im Gegensatz zum cholinergen reift das monoaminerge System viel eher (Lauder und Bloom 1974). Dies stimmt mit der frühen NREM-Schlaf Entwicklung überein, denn noradrenerge Neurone in der medullären *Formatio reticularis* induzieren den NREM-Schlaf.

Zusammenfassend kann man sagen, dass erstens das unreife ECoG keiner unreifen Form des REM-Schlaf-ECoG's entspricht und dass zweitens, ebenfalls anders als bisher angenommen, die Differenzierung der zyklischen ECoG-Aktivität und damit der Schlafstadien mit der

Reifung des NREM-Schlafes beginnt. Das REM-Schlaf-ECoG entwickelt sich erst zu einem viel späteren Zeitpunkt als das NREM-Schlaf-ECoG. Unsere Ergebnisse stimmen mit der Hypothese von Frank und Heller überein, die eine Entwicklung von REM- und NREM-Schlaf aus einem undifferenzierten Schlaf annahmen, welcher weder einem unreifen REM- noch NREM-Schlaf entspricht (Frank und Heller 2003). Die Ursache für die spätere Reifung des REM-Schlafes liegt wahrscheinlich in der späteren Reifung des cholinergen Systems, welches für die Generierung und Aufrechterhaltung von REM-Schlaf essentiell ist. Dagegen legen unsere Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen der frühen Entwicklung des NREM-Schlafes und der Reifung der noradrenergen Neuronen in der medullären Formatio reticularis welche den NREM-Schlaf induzieren nahe.

6.2.2 Effekte einer Glukokortikoidbehandlung auf die Schlafstadienentwicklung

Die pränatale Glukokortikoidtherapie hemmt auch im Gehirn das Wachstum zugunsten der Differenzierung, wie es in der Lunge gezeigt worden ist (Jobe 2001, Grier und Halliday 2004). Die Beschleunigung der neuronalen Differenzierung sollte die Entwicklung der fetalen Hirnfunktion vorantreiben. Unsere Resultate zeigen in der Tat, dass schon die einmalige Glukokortikoidgabe die Entwicklung der fetalen Hirnfunktion und dabei insbesondere die Entwicklung des REM-Schlaf-ECoG's beschleunigt. Dies geschieht allerdings auf Kosten einer fortbestehenden Schlafstadienfragmentierung, so dass nicht von einer reinen Beschleunigung sondern einer anderen Trajektorie der funktionellen Hirnentwicklung ausgegangen werden muss. Das REM-Schlaf-ECoG erreichte sechs Tage nach der ersten Betamethasoninjektion ein Stadium, welches dem ECoG der Kontrolltiere mehr als drei Wochen später ähnelte. Bedenkt man, dass die Schwangerschaftsdauer bei Schafen nur 146 Tage beträgt, verglichen mit 280 Tagen bei menschlichen Schwangerschaften, stellt dies eine ausgeprägte Beschleunigung der Entwicklung der neuronalen Funktionen, die das REM-Schlaf-ECoG induzieren, dar. Das medullo-pontine System, welches das REM-Schlaf-ECoG induziert und vermittelt, bezieht bei seiner Reifung kortikale Systeme nicht aber die thalamokortikalen Schrittmacherzentren, welche das NREM-Schlaf-ECoG erzeugen, ein (Steriade 2005, Pace-Schott und Hobson 2002).

Eine Wiederholung der Betamethasonbehandlung zeigte keine zusätzlichen Effekte. Ebenfalls war am 112. Gestationstag, nach Vorbehandlung mit Betamethason am 106. Gestationstag, kein akuter Abfall der ECoG-Aktivität nachweisbar. Dies kann zwei Gründe

haben: die Entwicklung der linearen und nichtlinearen REM-Schlaf-ECoG Eigenschaften ist nach dem ersten Betamethasonzyklus komplett, oder es kommt zu einer Resistenz gegen Glukokortikoidrezeptoren.

Das letzte Drittel der Schwangerschaft in welchem pränatale Glukokortikoide gewöhnlich verabreicht werden, ist ein kritischer Zeitraum in der Entwicklung der HPA-Achse (Challis und Brooks 1989, Magyar et al. 1980, Norman et al. 1985). Es ist durch einen Anstieg des fetalen ACTH- und Kortisol-Spiegels beim Schaf und Menschen charakterisiert. Interessanterweise folgt die Entwicklung der REM-Schlafstadien der Entwicklung der HPA-Achse. Die Entwicklung der HPA-Achse führt ungefähr am 125. Gestationstag, wenn sich der REM-Schlaf entwickelt, zu erhöhten fetalen Plasmakortisolspiegeln (Challis und Brooks 1989, Magyar et al. 1980, Norman et al. 1985). Der basale endogene Kortikosteroidspiegel ist für die Entwicklung des cholinergen Systems (Guijarro et al. 2006), welches für die REM-Schlaferzeugung und Aufrechterhaltung wesentlich ist (Steriade 2005, Pace-Schott und Hobson 2002), notwendig. Offensichtlich beschleunigt Betamethason die Entwicklung des cholinergen Systems. Tatsächlich erhöht Dexamethason die Synthese des nervalen Wachstumsfaktors (NGF) im zerebralen Kortex und im Hippokampus sich entwickelnder Ratten (Shi et al. 1998, Fabrazzo et al. 1991). Von dort wird NGF zu den cholinergen Neuronen der subkortikalen Hirnregionen in das basale Vorderhirn transportiert (DiStefano et al. 1992, Seiler und Schwab 1984, Shi et al. 1998). Indem es den NGF-Spiegel erhöht, könnte Betamethason die Entwicklung der cholinergen Systeme im Vorderhirn, im Mittelhirn und im Hirnstamm beschleunigen (Zahalka et al. 1993, Shi et al. 1998, Vantini et al. 1989, Puro 1983). Die medulläre *Formatio reticularis* und das dorsale pontine Tegmentum bilden den cholinergen Input für die pontine REM-Schlaf erzeugenden Strukturen (Pace-Schott und Hobson 2002). Cholinerge Neuronen des ponto-mesenzephalen Tegmentums fördern die kortikale Aktivierung während des REM-Schlafes über nicht-cholinerge thalamokortikale Neuronen und über cholinerge basale Vorderhirnneuronen, die eine hohe Azetylcholinausschüttung in dem zerebralen Kortex verursachen (Jones 2004, Steriade 2005, Pace-Schott und Hobson 2002).

Die spezifische Beteiligung der cholinergen Mechanismen bei der Erzeugung des REM-Schlafes kann die fehlenden Effekte von Betamethason auf die Reifung im NREM-Schlaf erklären. Die Entwicklung des NREM-Schlaf-ECoG's wird nach der Betamethasonbehandlung eher verzögert als beschleunigt. Wir nehmen an, dass dies durch Betamethasoneffekte auf das serotonerge, noradrenerge, GABAerge und/ oder glutamaterge System vermittelt wird. Noradrenerge Neurone im Locus coeruleus, serotonerge in den

dorsalen Raphe Kernen, GABAerge in den mesopontinen Kerngebieten und die thalamokortikalen glutamatergen Neurone sind für die NREM-Schlaferzeugung wichtig (Steriade 2005, Pace-Schott und Hobson 2002). Die Gabe von Dexamethason bei postnatalen Ratten, in einer Dosis die der hier verwendeten ähnlich ist und in einem Alter, das dem Hirnentwicklungsstand der Tiere in der vorliegenden Untersuchung entspricht, zeigte Störungen in den serotonergen synaptischen Funktionen bei der adulten Ratte (Slotkin et al. 2006). Das könnte die tendenzielle Verzögerung der NREM-Schlafentwicklung durch Betamethason erklären. Das Vorhandensein von Glukokortikoiden scheint damit sowohl beschleunigend als auch verzögernd auf die Hirnentwicklung zu wirken, abhängig vom Reifungsgrad der Neurone.

Ebenso ist der Wechsel zwischen REM- und NREM-Schlaf mit Änderungen in der Kortisolsekretion beim Menschen verbunden (Follenius et al. 1992, Born et al. 1986). Einige Studien bei Erwachsenen haben gezeigt, dass der NREM-Schlaf einen hemmenden Einfluss auf die Kortisolsekretion haben kann, weil dem NREM-Schlaf entweder eine Abnahme der Kortisolausschüttung vorangeht oder er mit dieser einhergeht (Bierwolf et al. 1997, Weitzman et al. 1983, Gronfier et al. 1997, Gronfier et al. 1998). Obgleich ein Zusammenhang zwischen der Kortisolsekretion und der EEG-Betaaktivität während des Schlafes noch nicht nachgewiesen wurde, ist eine zeitliche Koppelung zwischen der Betaaktivität im EEG und der Kortisolsekretion während des Wachseins gezeigt worden (Chapotot et al. 1998).

Die beschleunigte Entwicklung des REM-Schlafes wird mit einer andauernden Schlafstadienfragmentierung bezahlt. Die Schlafstadienlänge wird durch einen ultradianen Oszillator im mesopontinen Übergang gesteuert (Pace-Schott und Hobson 2002). Die exekutive Kontrolle dieses Oszillators bezieht eine wechselseitige Interaktion zwischen aminergen REM-off und cholinergen REM-on Neuronen ein, die über GABAerge und glutamaterge neuronale Verschaltungen abgestimmt sind. Dieser ultradiane Rhythmus wird durch einen zirkadianen Oszillator im Nucleus suprachiasmaticus gesteuert (Pace-Schott und Hobson 2002), welcher Informationen direkt (Sun et al. 2000) oder über den dorsomedialen hypothalamischen Kern (Chou et al. 2002) zum hypothalamischen ventrolateral präoptischen Kern sendet, der in die aminergen Hirnstammkerne projiziert (Locus coeruleus und dorsale Raphe Kerne). Somit wird der NREM- oder REM-Schlaf abhängig von der Aktivität der Neurone im ventrolateralen präoptischen Kern gefördert (Lu et al. 2000).

Betamethason verursacht möglicherweise die Schlafstadienfragmentierung durch eine direkte Beeinflussung der Entwicklung des ultradianen Oszillators. Eine andere Möglichkeit besteht in der Änderung der Empfindlichkeit von Glukokortikoidrezeptoren vom Typ-II. Glukokortikoide haben beim Adulten auch akute Schlaf deprimierende und -fragmentierende Effekte, die, so die Vorstellung, durch direkte Wirkung an zentralen Glukokortikoid- oder Typ-II-Rezeptoren vermittelt werden (Steiger 2002). Während der Entwicklung der HPA-Achse verursachen möglicherweise erhöhte Glukokortikoidspiegel persistierende Änderungen der Empfindlichkeit von Glukokortikoid- oder Typ-II-Rezeptoren, die die Aktivität der HPA-Achse programmieren (Welberg et al. 2001). In der Tat zeigten fetale Schafe zwei Wochen nach einer Betamethasonbehandlung mit dem gleichen experimentellen Protokoll wie in der vorliegenden Untersuchung Funktionsstörungen der HPA-Achse (Schwab et al. 2009). Während die Schlafstadienfragmentierung am 112. Gestationstag offenbar durch den ersten Zyklus der Betamethasonbehandlung am 106. Gestationstag verursacht wird, können wir aus unseren Resultaten nicht folgern, ob die Persistenz der Schlafstadienfragmentierung nur durch den ersten Zyklus der Betamethasonbehandlung hervorgerufen wird oder ob sie durch die wiederholte Betamethasonbehandlung am 112. und 118. Gestationstag noch verstärkt wird. Ähnlich induziert pränataler Stress bei Kindern (Stott 1973) und nicht menschlichen Primaten (Schneider 1992) abnormales Schlafverhalten. Eine Schlafstadienfragmentierung bleibt bei der Ratte nach pränatalem Stress bis in das Erwachsenenalter bestehen (Dugovic et al. 1999). Bei Menschen weisen Neugeborene von sehr ängstlichen Müttern mehr Schlafstadienwechsel auf (Field et al. 2003).

Die Schlafstadienfragmentierung ist ein wichtiges Symptom bei der menschlichen Depression (Tsuno et al. 2005). Damit ist eine pränatale Glukokortikoidbehandlung möglicherweise prädisponierend für Verhaltensänderungen und Depressionen im späteren Leben. In der Tat zeigten sich bei wiederholten pränatalen Betamethasonbehandlungen Störungen der biophysikalischen Aktivität bei menschlichen Feten (Jackson et al. 2003), eine verzögerte Reifung der Aktivität und der Stabilität des autonomen Nervensystems bei den Neugeborenen (Field et al. 2003) sowie Verhaltens- und Aufmerksamkeitsstörungen während der Kindheit (French et al. 2004). Obgleich pränataler Stress zu Änderungen im Gedächtnis und Verhalten sowie zu Depressionen im Erwachsenenalter führt (Kofman 2002, Pariante und Miller 2001, Hanley und Van de Kar 2003) und eine mehrfache prä- oder postnatale Glukokortikoidbehandlung kognitive und psychomotorische Auffälligkeiten im Kindesalter bewirkt (Yeh et al. 2004, French et al. 2004), konnten bei Erwachsenen keine Effekte einer einmaligen pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die neurologische und kognitive Funktion gezeigt werden (Dessens et al. 2000, Dalziel et al. 2005). In

Übereinstimmung mit der Annahme einer durch Betamethason verursachten Prädisposition für Depressionen führte eine perinatale Dexamethasonbehandlung an Ratten zu Änderungen der serotonergen synaptischen Funktion bei den adulten Ratten (Slotkin et al. 2006). Eigene unveröffentlichte Beobachtungen zeigen, dass eine pränatale Dexamethasonbehandlung bei Ratten mit der Dosis die hier benutzt wurde, Symptome einer Depression bei der gealterten Ratte im Senium verursacht. In der Tat sind Schlafstörungen, welche eines der Hauptsymptome der Depression sind (Claes 2004, Steckler et al. 1999, Swaab et al. 2005, Barden 2004, Tichomirowa et al. 2005, Parker et al. 2003, Pariante 2003, Gold und Chrousos 2002, Gillespie und Nemeroff 2005), bei depressiven Patienten eng mit Störungen der HPA-Achse verbunden (Poland et al. 1992, Hubain et al. 1998). Die Hyperaktivität der Stressachse kann an einer Desensibilisierung der Glukokortikoidrezeptoren, wie sie z.B. experimentell durch erhöhte Glukokortikoidspiegel während der pränatalen Reifung der HPA-Achse im letzten Drittel der Gestation hervorgerufen werden (Schwab et al. 2009, Übersicht in Seckl 2004 und Welberg und Seckl 2001), liegen, was zu einer insuffizienten negativen Rückkopplung der HPA-Achse führt (Pariante 2004). Eine Desensibilisierung der Glukokortikoidrezeptoren könnte auch das Fehlen von Effekten einer wiederholten Betamethasonbehandlung in den vorliegenden Untersuchungen auf die funktionelle Hirnreifung erklären.

Zusammenfassend führen Glukokortikoide wahrscheinlich über eine spezifische Induktion der Reifung des cholinergen Systems zu einer früheren Differenzierung des REM-Schlaf-ECoG's. Die linearen und nichtlinearen REM-Schlaf-ECoG-Eigenschaften erreichen bereits 6 Tage nach der ersten Betamethasongabe ein Reifungsstadium das unter Kontrollbedingungen erst 24 Tage später erreicht wird. Die thalamokortikalen Verschaltungen sowie das noradrenerge und serotonerge System, welche das NREM-Schlaf-ECoG generieren, scheinen von dem Reifungsstimulus unbeeinflusst zu bleiben. Die Stimulierung der Reifung scheint damit nur bestimmte funktionelle Systeme zu betreffen, die sich zum Zeitpunkt erhöhter Glukokortikoidspiegel, seien sie durch exogene Glukokortikoidgaben oder Stress verursacht, in einer vulnerablen Phase befinden. Da die Reifungsbeschleunigung damit nur bestimmte zerebrale Systeme betrifft, kommt es wahrscheinlich zu Dysbalancen mit anderen funktionellen zerebralen Systemen. So geht die vorzeitige Reifung des REM-Schlafes auf Kosten einer permanenten Fragmentierung der Schlafstadien. Unsere Resultate sind von enormer praktischer Bedeutung, da die Effekte in einem klinisch relevanten Alter und unter der Dosis Betamethason wie sie klinisch zur Beschleunigung der fetalen Lungenreifung verwendet wird, auftreten (NIH 1995).

6.2.3 Akute Effekte einer pränatalen Betamethasonbehandlung

Nachdem wir zeigen konnten, dass Glukokortikoide die Hirnreifung beschleunigen, überprüften wir die akuten Effekte von Glukokortikoiden auf die fetale ECoG-Aktivität.

Dabei konnte am 112. Gestationstag ein Abfall der spektralen Leistung 6 Stunden nach Betamethasongabe im REM- und auch im NREM-Schlaf-ECoG gesehen werden. Dieser Abfall war jedoch nach einer Vorbehandlung mit Betamethason am 106. Gestationstag nicht mehr nachweisbar. Darüber hinaus zerstört eine pränatale Betamethasonbehandlung am 106. Gestationstag die zirkadiane Rhythmik der REM-Schlafstadienlänge anhaltend.

Die akuten aber nur vorübergehend auftretenden unterdrückenden Effekte von Betamethason auf die elektrokortikale Aktivität werden von anderen Mechanismen als die Effekte von Betamethason auf die Reifung verursacht. Die akuten Effekte treten erst ab dem 112. Gestationstag auf, also erst nachdem die Schlafstadien zu reifen beginnen.

Die Hemmung der Erregbarkeit von größeren kortikalen neuronalen Populationen könnte zu den ECoG-Veränderungen beitragen, die in der vorliegenden Untersuchung beobachtet wurden. Bei Kaninchen ist eine Hemmung der neuronalen Erregbarkeit durch Dexamethason, das epileptiforme Entladungen verhindert, berichtet worden (Pieretti et al. 1992). Die akute Störung der neuronalen Erregbarkeit steht in Übereinstimmung mit den durch Betamethason verursachten akuten Verhaltensänderungen als Ausdruck einer autonomen Funktionsstörung (Mulder et al. 1997, Mulder et al. 2004, Senat et al. 1998) und der Verzögerung der akustisch evozierten Potentiale bei menschlichen Feten (Schleussner et al. 2004).

Betamethason besitzt eine spezifische Affinität zu Glukokortikoidrezeptoren vom Typ-II, die in den meisten Hirnregionen einschließlich dem zerebralen Kortex gefunden werden (Ahima et al. 1991, Cintra et al. 1994). Glukokortikoidrezeptoren sind auch im Gehirn der fetalen Schafe, in dem Schwangerschaftsalter in welchem wir unsere Untersuchungen durchführten, nachweisbar (Brodhun et al. 2003). Glukokortikoid- oder Typ-II-Rezeptoren beeinflussen besonders das noradrenerge System. Eine Aktivierung der Typ-II-Rezeptoren unterdrückt die Erregbarkeit in der hippokampalen Area CA1 Region (Joels und de Kloet 1992, Joels und de Kloet 1994). Jedoch gibt es nur ein sehr begrenztes Wissen über die Glukokortikoideffekte auf die Eigenschaften von neuronalen Membranen außerhalb des Hippokampus (Hua und Chen 1989). Durch Glukokortikoide verursachte Änderungen der elektrokortikalen Hirnfunktion könnten ebenfalls auf direkte Membraneffekte (Joels 2000, Joels 2001) sowie auf Interaktionen mit membranassoziierten Rezeptoren, welche an Ionenkanälen gekoppelt

sind (McEwen 1994, Moore et al. 1995, Borski 2000), zurückgeführt werden. Des Weiteren kommen als Ursache eine Aktivierung von second messenger Systemen, durch welche elektrische Membraneigenschaften moduliert werden (McEwen 1994, Moore et al. 1995, Borski 2000), katabole Glukokortikoideffekte (Schwab et al. 2006) sowie direkte Effekte auf Synapsen (Antonow-Schlorke et al. 2001) oder die Funktionen des neuronalen Zytoskelettes (Schwab et al. 2001b) in Frage. Am wahrscheinlichsten werden die akuten Betamethasoneffekte auf die neuronale Erregbarkeit durch rezeptorvermittelte Effekte hervorgerufen, weil die Effekte 2h und 6h nach Betamethasongabe auftraten. Direkte Membraneffekte sind schnell und treten innerhalb von Sekunden auf (Falkenstein et al. 2000). Außerdem traten diese Effekte nicht auf, nachdem die Tiere am 106. Gestationstag vorbehandelt wurden, was auf die Entwicklung einer Glukokortikoidresistenz der Rezeptoren hindeutet. Im Gegensatz dazu war die durch Betamethason verursachte Unterbrechung der zirkadianen Rhythmizität der REM-Schlafstadienlänge unabhängig von einer Vorbehandlung. Hier ist am ehesten ein Effekt auf die zirkadianen Regulatoren wahrscheinlich.

Die zirkadianen Schwankungen der REM-Schlaflänge ähneln den ausgeprägten zirkadianen Rhythmen der fetalen Herzfrequenz, von Prolaktin, Glukose, Wachstumshormonen und der Körpertemperatur, die bei der späten Schwangerschaft bei menschlichen Feten und den Feten anderer Spezies wie Schafen und Nagetieren nachgewiesen wurden (McMillen et al. 1987, Simonetta et al. 1991, Reppert 1992, Mirmiran et al. 2003b, Rivkees 2003, Weinert 2005, Lunshof et al. 1998, Vergara et al. 1989, Reppert et al. 1988, Weaver und Reppert 1987, Recabarren et al. 1987, Reppert und Schwartz 1986). Die zirkadiane Rhythmik dieser Funktionen bei Frühgeborenen deutet darauf hin, dass menschliche Feten schon in der 30. SSW endogene Rhythmen erzeugen können (Mirmiran und Lunshof 1996). Postnatal wird die zirkadiane Rhythmik des REM-Schlafes durch den Nucleus suprachiasmaticus gesteuert und ist abhängig von der hormonalen Regelung durch Kortisol und Melatonin (Wurts und Edgar 2000, Steiger 2002). Z.B. ist dies an einem vermehrten Anteil von REM-Schlaf während des morgendlichen Kortisolpeaks nachweisbar (Steiger 2002). Während beim Menschen die Kortisolspiegel mit einem hohen Spiegel am Morgen und abfallenden Spiegeln am Abend tageszeitlich schwanken (Van Cauter und Refetoff 1985 219), wird der tägliche Kortisolrhythmus des Mutterschafts und mit 2-4 Stunden Verzögerung der des Feten durch die Fütterung moduliert (Simonetta et al. 1991, Fehm et al. 1986, Friess et al. 1994, Friess et al. 1995, Born et al. 1987, Born et al. 1989, Gillin et al. 1972, Feinberg et al. 1984). Beim Schaffeten gibt es am 112. Gestationstag noch keinen endogenen zirkadianen Rhythmus der fetalen ACTH-, Kortisol- und Melatoninspiegel (McMillen et al. 1987,

Simonetta et al. 1991, Bell und Wood 1991, Parraguez et al. 1989, Kennaway 2000, Challis und Brooks 1989). Die fetale ACTH-Ausschüttung und die rhythmische Kortisolsekretion beginnt erst nach dem 125. Gestationstag mit der Reifung der HPA-Achse (Challis und Brooks 1989), obwohl sich die Funktion des Nucleus suprachiasmaticus bereits in der Mitte der Schwangerschaft entwickelt (Reppert 1992, Mirmiran et al. 2003a, Rivkees 2003, Weinert 2005). Das im Feten vorhandene Melatonin stammt zum überwiegenden Teil vom Muttertier, da es im Gegensatz zu Kortisol die Plazentaschranke überwinden kann (McMillen und Nowak 1989a) und der Fetus in dem von uns untersuchten Alter noch kein Melatonin produziert.

Die zirkadianen fetalen Rhythmen in dem von uns untersuchten Gestationsalter werden generell durch die mütterlichen Rhythmen moduliert (Lunshof et al. 1998). Dabei beträgt die endogene Periodendauer bereits beim Feten 25 Stunden und benötigt eine ununterbrochene Korrektur durch Umwelteinflüsse (Reppert 1992, Reppert und Schwartz 1986, Reppert et al. 1988, Mirmiran et al. 2003a, Rivkees 2003, Weinert 2005, McMillen und Nowak 1989b, Honma et al. 1984). Die zirkadianen Veränderungen der REM-Schlaflänge werden im untersuchten Gestationsalter wahrscheinlich nicht durch die Aktivität der fetalen HPA-Achse gesteuert, denn sie ist noch unreif. Sie werden auch nicht durch die mütterliche HPA-Achse gesteuert, denn ACTH kann nicht durch die Plazenta in das fetale Blut übertreten und die Kortisolübertragung von der Mutter auf den Feten wird effektiv durch die plazentare 11- β Hydroxysteroiddehydrogenase kontrolliert. Die endogene fetale Kortisol- und ACTH-Ausschüttung ist bei der noch unreifen fetalen HPA-Achse nicht ausgebildet.

Die Synchronisierung der mütterlichen und fetalen zirkadianen Rhythmen wird am wahrscheinlichsten durch Melatonin, das von der Mutter stammt und plazentagängig ist, hervorgerufen (Zemdegs et al. 1988). Infolgedessen scheinen die akuten Störungen der zirkadianen Änderungen der REM-Schlaflänge durch Betamethason wahrscheinlich über eine Modulation der mütterlichen Melatoninsekretion durch die Betamethasonbehandlung oder durch Betamethasoneffekte auf die Funktion des fetalen Nucleus suprachiasmaticus vermittelt zu werden.

Ein weiterer Neurotransmitter zur Steuerung von endogenen zirkadianen Rhythmen ist Vasopressin, ein Neuropeptid welches in Neuronen des Nucleus suprachiasmaticus enthalten ist. Es ist in der Lage beim Erwachsenen auch während des Fehlens von anderen Zeitgebern eine zirkadiane Rhythmik hervorzurufen und ein zirkadianes Signal zu den peripheren ultradianen Oszillatoren zu übermitteln (Pace-Schott und Hobson 2002, Isobe und Isobe

1998). Exogene Glukokortikoide wie Dexamethason führen zu einer erhöhten Expression der Vasopressin mRNA im Nucleus suprachiasmaticus beim Menschen (Liu et al. 2006) und bei der Ratte (Isobe und Isobe 1998, Larsen et al. 1994). Dies könnte ebenfalls eine Ursache der Störungen des zirkadianen Rhythmus der REM-Schlaflänge während der Glukokortikoidtherapie sein. Dexamethason verursacht darüber hinaus bei Ratten postnatal auch vorübergehend eine Änderung der zirkadianen Genexpression in peripheren Oszillatoren (Balsalobre et al. 2000).

Auch postnatal unterliegt die elektrokortikale Hirnaktivität im REM- und NREM-Schlaf zirkadianen Rhythmen (Dijk 1999). Die Betaaktivität im EEG fällt unabhängig von einer kortikalen Aktivierung ab. Parallel dazu zeigt die Kortisolsekretion im Tagesverlauf ähnliche abfallende Spiegel mit begleitenden zyklischen Veränderungen wie in unseren Untersuchungen (Chapotot et al. 1998).

7 Schlussfolgerungen

Mit unseren Ergebnissen leisten wir einen wesentlichen Beitrag zu der jahrzehntelang diskutierten Frage nach der Entwicklung der Schlafstadien. Dabei bestand die Frage, wie früh während der Ontogenese REM- oder unreifer Schlaf auftritt und ob der unreife Schlaf eine frühe Form des REM-Schlafes darstellt. Ein frühes - und primäres Auftreten von REM-Schlaf wurde angenommen, da das Baby zur Geburt einen wesentlichen Teil der Schlafzeit im REM-Schlaf verbringt und der REM-Schlaf über die gesamte Lebensspanne abnimmt. Daraus wurde geschlossen, dass der REM-Schlaf als unspezifischer Stimulus eine wesentliche Bedeutung für die Entwicklung der neuronalen Funktion hat. Wir konnten zeigen, dass sich die zyklische ECoG-Aktivität aus einem unreifen Schlafstadium, welches sich in linearen und nichtlinearen Eigenschaften vom REM- und NREM-Schlaf-ECoG unterscheidet, entwickelt. Die Reifung des NREM-Schlafes erfolgt im Gegensatz zu bisherigen Vermutungen vor der Reifung des REM-Schlafes, das heißt die Reifung der elektrischen Hirnaktivität synchronisierenden thalamischen Neuronenpopulationen führt zur Herausbildung von zyklischer ECoG-Aktivität. Daraufhin erfolgt die funktionelle Entwicklung des kortikalen neuronalen Netzwerkes, das im REM-Schlaf aktiv ist. Der Nachweis, dass die unreife kortikale Aktivität keine Ähnlichkeit zum REM-Schlaf aufweist, und dass sich REM-Schlaf später als der NREM-Schlaf entwickelt, steht im Gegensatz zu der Vorstellung, dass REM-Schlaf während der frühen Hirnentwicklung zu einem großen zeitlichen Anteil vorherrscht (Mirmiran et al. 1981, Jouvet-Mounier et al. 1970, Roffwarg et al. 1966). Daraus ergibt sich auch, dass der REM-Schlaf möglicherweise weniger bedeutend für die frühe funktionelle Hirnentwicklung ist als bisher angenommen. Konsequenterweise müssen einige der Theorien über die Funktion des REM-Schlafes überarbeitet werden, wenn auch nicht klar ist, ob unreifer Schlaf dieselben Funktionen während der Entwicklung besitzt, wie den bisherigen Annahmen zufolge der REM-Schlaf. Dabei kann REM-Schlaf die ihm zugeschriebenen Funktionen durchaus nach seinem Auftreten haben, da der REM-Schlaf perinatal wesentlich dominanter als im späteren Leben ist. Unsere Resultate ändern und erweitern unser Verständnis über die Entwicklung des REM- und NREM-Schlafes und besonders über die Funktion des REM-Schlafes während der Entwicklung und des frühen Lebens grundsätzlich.

Da das unreife Schlaf-ECoG zum Beginn unserer Aufzeichnungen am 106. Gestationstag, etwa der 27. SSW beim Menschen entsprechend, schon unreife zyklische Aktivität nichtlinearer Eigenschaften des ECoG zeigte, sind - obgleich technisch schwierig - weitere

Studien notwendig, um zu untersuchen, in welchem Gestationsalter sich diese zyklische Aktivität zu entwickeln beginnt.

Bereits eine Einmalgabe von Betamethason, in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung genutzten Dosis, fördert die Reifung der fetalen Hirnfunktion und zwar spezifisch die Entwicklung des REM-Schlaf-ECoG's aufgrund einer Induktion der Reifung des cholinergen Systems. So beschleunigt Betamethason die Entwicklung der kortikalen neuronalen Aktivität, die das REM-Schlaf-ECoG generiert, aber nicht die thalamokortikalen Verschaltungen, die das NREM-Schlaf-ECoG erzeugen. Neben der Induktion der Reifung der fetalen Hirnfunktion hat Betamethason akute transiente Effekte auf die Hirnfunktion, die die klinisch beobachteten akuten Verhaltensänderungen nach Betamethason erklären (Mulder et al. 1994).

Die Beschleunigung der funktionellen Hirnentwicklung nach einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung ähnelt den Effekten von Glukokortikoiden auf die Lungenreifung. Diese durch Glukokortikoide bedingte Reifungsinduktion stellt einen unspezifischen Effekt auf sich in der Reifung befindender Gewebe dar, wobei es zu einer Förderung der Differenzierung auf Kosten der Zellteilung kommt.

Die fehlende Wirkung einer repetitiven Behandlung mit Betamethason ist wahrscheinlich auf eine Glukokortikoidrezeptorresistenz zurückzuführen. Glukokortikoidrezeptorresistenz ist ein typisches Zeichen einer fetalen Programmierung, welche mit einer Störung der HPA-Achse einhergeht. Werden dabei Glukokortikoidrezeptoren im Hippokampus in dem Zeitraum, in welchem die HPA-Achse reift, hohen Kortisolspiegeln ausgesetzt, kommt es zu einer Sollwertverstellung der Rezeptoren im Sinne einer permanenten Desensitivierung und damit zu einer verminderten negativen Rückkopplung der HPA-Achse. Die während der Reifung aufgetretenen höheren Kortisolspiegel werden als „normal“ angesehen. Es werden aufgrund der verminderten negativen Rückkopplung zeitlebens höhere Kortisolspiegel toleriert, und in Stresssituationen wird vermehrt Kortisol ausgeschüttet.

Die Reifung des REM-Schlafes geht dabei auf Kosten einer Schlafstadienfragmentierung. Zusätzlich kommt es zu einer Störung der zirkadianen Rhythmik der REM-Schlafstadienlänge. Die Störung der Schlafarchitektur ist ein typisches Syndrom bei depressiven Patienten (Tsuno et al. 2005) und pränatal gestressten Ratten, bei denen der Effekt bis zum Adulten anhält (Dugovic et al. 1999). Eine Überaktivität der HPA-Achse vermittelt nicht nur Symptome einer Depression über eine Suppression des serotonergen

Systems (Leonard 2005), sondern verursacht auch andauernde Verhaltens- und kognitive Störungen (Mulder et al. 2002, Buitelaar et al. 2003, Maccari et al. 2003, King und Laplante 2005, Sloboda et al. 2005, Van den Bergh et al. 2005), die bis in das spätere Leben fortbestehen. Der Umfang, in dem diese Änderungen die postnatale Hirnfunktion beeinflussen, bleibt noch zu untersuchen. Interessanterweise könnten somit einige der Schlafstörungen, die in der Gesellschaft sehr häufig vorkommen, ihre Anfänge in Störungen während der Kindheit haben.

Durch unsere Untersuchung der normalen Entwicklung zyklischer elektrokortikaler Hirnfunktionen konnten weitreichende Einblicke in die Entstehung der einzelnen Schlafstadien gewonnen werden. Wahrscheinlich sind mit diesen Ergebnissen neue Erkenntnisse über die Funktion des Schlafes oder Einblicke in die Schlafpathologie bei Neugeborenen möglich. Unsere Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss einer einmaligen Betamethasonbehandlung auf die Entwicklung der Schlafstadien und die Aktivität der HPA-Achse und machen lang anhaltende Effekte wahrscheinlich, wobei sich die postnatalen Auswirkungen noch nicht abschätzen lassen. Die Indikation zu einer pränatalen Glukokortikoidtherapie sollten daher weiterhin sehr kritisch gestellt werden, wobei der Nutzen, der mit einer Induktion der Lungenreifung und damit dem Überleben des Kindes erreicht wird, bei der Entscheidung im Vordergrund stehen sollte.

8 Literatur und Quellenverzeichnis

- Abarbanel HD, Brown R, Kadtke JB. 1990. Prediction in chaotic nonlinear systems: Methods for time series with broadband Fourier spectra. *Physical Review A*, 41 (4):1782-1807.
- Adamson SL, Kingdom J. 1999. Antenatal betamethasone and fetoplacental blood flow. *Lancet*, 354 (9174):255-256.
- Aftanas LI, Lotova NV, Koshkarov VI, Makhnev VP, Mordvintsev YN, Popov SA. 1998. Non-linear dynamic complexity of the human EEG during evoked emotions. *Int J Psychophysiol*, 28 (1):63-76.
- Aghajafari F, Murphy K, Matthews S, Ohlsson A, Amankwah K, Hannah M. 2002. Repeated doses of antenatal corticosteroids in animals: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*, 186 (4):843-849.
- Ahima R, Krozowski Z, Harlan R. 1991. Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol*, 313 (3):522-538.
- Ahima RS, Harlan RE. 1990. Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 39 (3):579-604.
- Albano AM, Muench J, Schwartz C, Mees AI, Rapp PE. 1988. Singular-value decomposition and the Grassberger-Procaccia algorithm. *Physical Review A*, 38 (6):3017-3026.
- Amiel-Tison C, Cabrol D, Denver R, Jarreau PH, Papiernik E, Piazza PV. 2004. Fetal adaptation to stress. Part I: acceleration of fetal maturation and earlier birth triggered by placental insufficiency in humans. *Early Hum Dev*, 78 (1):15-27.
- Anders TF, Sadeh A, Appareddy V. 1995. Normal sleep in neonates and children. In: Ferber R, Kryger M, Hrsg. *Principles and Practice of Sleep Medicine in the Child*. 1te Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders Company,, 7-18.
- Antonow-Schlorke I, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW. 2003. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J Physiol*, 547 (Pt 1):117-123.
- Antonow-Schlorke I, Kuhn B, Muller T, Schubert H, Sliwka U, Nathanielsz PW, Schwab M. 2001. Antenatal betamethasone treatment reduces synaptophysin immunoreactivity in presynaptic terminals in the fetal sheep brain. *Neurosci Lett*, 297 (3):147-150.
- Arabin B, Riedewald S. 1992. An attempt to quantify characteristics of behavioral states. *Am J Perinatol*, 9 (2):115-119.
- Astic L, Sastre JP, Brandon AM. 1973. Etude polygraphique des etats de vigilance chez le foetus de cobaye. *Physiol Behav*, 11 (5):647-654.
- Astrom KE. 1967. On the early development of the isocortex in fetal sheep. *Prog Brain Res*, 26:1-59.
- Ballard PL, Ballard RA. 1995. Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *Am J Obstet Gynecol*, 173 (1):254-262.
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289 (5488):2344-2347.
- Barden N. 2004. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. *J Psychiatry Neurosci*, 29 (3):185-193.
- Bazhenov M, Timofeev I, Steriade M, Sejnowski TJ. 2002. Model of thalamocortical slow-wave sleep oscillations and transitions to activated States. *J Neurosci*, 22 (19):8691-8704.
- Bell ME, Wood CE. 1991. Do plasma ACTH and cortisol concentrations in the late-gestation fetal sheep vary diurnally? *J Dev Physiol*, 15 (5):277-282.

- Benesova O, Pavlik A. 1989. Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain. *Neuropharmacology*, 28 (1):89-97.
- Berry LM, Polk DH, Ikegami M, Jobe AH, Padbury JF, Ervin MG. 1997. Preterm newborn lamb renal and cardiovascular responses after fetal or maternal antenatal betamethasone. *Am J Physiol*, 272 (6 Pt 2):R1972-1979.
- Bierwolf C, Struve K, Marshall L, Born J, Fehm HL. 1997. Slow wave sleep drives inhibition of pituitary-adrenal secretion in humans. *J Neuroendocrinol*, 9 (6):479-484.
- Borghese IF, Minard KL, Thoman EB. 1995. Sleep rhythmicity in premature infants: implications for development status. *Sleep*, 18 (7):523-530.
- Born J, Zwick A, Roth G, Fehm-Wolfsdorf G, Fehm HL. 1987. Differential effects of hydrocortisone, fluocortolone, and aldosterone on nocturnal sleep in humans. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 116 (1):129-137.
- Born J, Spath-Schwalbe E, Schwakenhofer H, Kern W, Fehm HL. 1989. Influences of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin, and cortisol on sleep in normal man. *J Clin Endocrinol Metab*, 68 (5):904-911.
- Born J, Kern W, Bieber K, Fehm-Wolfsdorf G, Schiebe M, Fehm HL. 1986. Night-time plasma cortisol secretion is associated with specific sleep stages. *Biol Psychiatry*, 21 (14):1415-1424.
- Borski RJ. 2000. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol Metab*, 11 (10):427-436.
- Bowe-Anders C, Adrien J, Roffwarg HP. 1974. Ontogenesis of ponto-geniculo-occipital activity in the lateral geniculate nucleus of the kitten. *Exp Neurol*, 43 (1):242-260.
- Brand SR, Engel SM, Canfield RL, Yehuda R. 2006. The effect of maternal PTSD following in utero trauma exposure on behavior and temperament in the 9-month-old infant. *Ann N Y Acad Sci*, 1071:454-458.
- Brodhun M, Coksaygan T, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M. 2003. Association of programmed cell death and glucocorticoid receptors during brain development in fetal sheep. *J Soc Gynecol Invest*, 10:765.
- Buitelaar JK, Huizink AC, Mulder EJ, de Medina PG, Visser GH. 2003. Prenatal stress and cognitive development and temperament in infants. *Neurobiol Aging*, 24 Suppl 1:S53-60; discussion S67-58.
- Bywood PT, Johnson SM. 2000. Dendrite loss is a characteristic early indicator of toxin-induced neurodegeneration in rat midbrain slices. *Exp Neurol*, 161 (1):306-316.
- Challis JR, Brooks AN. 1989. Maturation and activation of hypothalamic-pituitary adrenal function in fetal sheep. *Endocr Rev*, 10 (2):182-204.
- Chapotot F, Gronfier C, Jouny C, Muzet A, Brandenberger G. 1998. Cortisol secretion is related to electroencephalographic alertness in human subjects during daytime wakefulness. *J Clin Endocrinol Metab*, 83 (12):4263-4268.
- Chase MH. 1971. Brain stem somatic reflex activity in neonatal kittens during sleep and wakefulness. *Physiol Behav*, 7 (2):165-172.
- Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB. 2002. Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci*, 22 (3):977-990.
- Cintra A, Zoli M, Rosen L, Agnati LF, Okret S, Wikstrom AC, Gustaffsson JA, Fuxe K. 1994. Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 62 (3):843-897.
- Claes SJ. 2004. CRH, stress, and major depression: a psychobiological interplay. *Vitam Horm*, 69:117-150.
- Clewlow F, Dawes GS, Johnston BM, Walker DW. 1983. Changes in breathing, electrocortical and muscle activity in unanaesthetized fetal lambs with age. *J Physiol*, 341:463-476.

- Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, Fuchs E. 2003. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychiatry*, 54 (10):1025-1034.
- Corner M. 1985. Ontogeny of brain sleep mechanisms. In: McGinty D, Hrsg. *Brain Mechanisms of Sleep*. Aufl. New York: Raven Press, 175-196.
- Coyle JT, Yamamura HI. 1976. Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Res*, 118 (3):429-440.
- Crowley PA. 1995. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol*, 173 (1):322-335.
- Curzi-Dascalova L, Peirano P, Morel-Kahn F. 1988. Development of sleep states in normal premature and full-term newborns. *Dev Psychobiol*, 21 (5):431-444.
- Curzi Dascalova L, Figueroa J, Eiselt M, Christova E, Virassamy A, d'Allest A, Guimaraes H, Gaultier C, Dehan M. 1993. Sleep state organization in premature infants of less than 35 weeks' gestational age. *Pediatr Res*, 34.:624-628.
- Dalziel SR, Lim VK, Lambert A, McCarthy D, Parag V, Rodgers A, Harding JE. 2005. Antenatal exposure to betamethasone: psychological functioning and health related quality of life 31 years after inclusion in randomised controlled trial. *Bmj*, 331 (7518):665.
- Dawes GS, Gardner WM, Johnston BM, Walker DW. 1980. Activity of intercostal muscles in relation to breathing movements, electrocortical activity and gestational age in fetal lambs. *J Physiol*, 307:47-48.
- De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Sutanto W, Levine S. 1988. Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res*, 73:101-120.
- DeKosky ST, Nonneman AJ, Scheff SW. 1982. Morphologic and behavioral effects of perinatal glucocorticoid administration. *Physiol Behav*, 29 (5):895-900.
- Demarini S, Dollberg S, Hoath SB, Ho M, Donovan EF. 1999. Effects of antenatal corticosteroids on blood pressure in very low birth weight infants during the first 24 hours of life. *J Perinatol*, 19 (6 Pt 1):419-425.
- Derks JB, Mulder EJ, Visser GH. 1995. The effects of maternal betamethasone administration on the fetus. *Br J Obstet Gynaecol*, 102 (1):40-46.
- Derks JB, Giussani DA, Jenkins SL, Wentworth RA, Visser GH, Padbury JF, Nathanielsz PW. 1997. A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol*, 499 (Pt 1):217-226.
- Dessens AB, Haas HS, Koppe JG. 2000. Twenty-year follow-up of antenatal corticosteroid treatment. *Pediatrics*, 105 (6):E77.
- Dijk DJ. 1999. Circadian variation of EEG power spectra in NREM and REM sleep in humans: dissociation from body temperature. *J Sleep Res*, 8 (3):189-195.
- DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schick CM, Lindsay RM, Wiegand SJ. 1992. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron*, 8 (5):983-993.
- Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3 (1):79-83.
- Doyle P, Guillaume-Gentil C, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1994. Effects of corticosterone administration on local cerebral glucose utilization of rats. *Brain Res*, 645 (1-2):225-230.
- Dreyfus-Brisac C. 1975. Neurophysiological studies in human premature and full-term newborns. *Biol Psychiatry*, 10 (5):485-496.
- Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O. 1999. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *J Neurosci*, 19 (19):8656-8664.

- Duval D, Durant S, Homo-Delarche F. 1983. Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim Biophys Acta*, 737 (3-4):409-442.
- Elimian A, Verma U, Canterino J, Shah J, Visintainer P, Tejani N. 1999. Effectiveness of antenatal steroids in obstetric subgroups. *Obstet Gynecol*, 93 (2):174-179.
- Endo Y, Jinnai K, Endo M, Fujita K, Kimura F. 1990. Diurnal variation of cerebral blood flow in rat hippocampus. *Stroke*, 21 (10):1464-1469.
- Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240 (4854):889-895.
- Fabrazzo M, Costa E, Mocchetti I. 1991. Reserpine stimulates nerve growth factor biosynthesis in developing rat brain: steroids as possible mediators.. *Mol Pharmacol*, 39:144 –149.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, 52 (4):513-556.
- Fehm HL, Benkowitsch R, Kern W, Fehm-Wolfsdorf G, Pauschinger P, Born J. 1986. Influences of corticosteroids, dexamethasone and hydrocortisone on sleep in humans. *Neuropsychobiology*, 16 (4):198-204.
- Feinberg M, Carroll BJ, King D, Greden JF. 1984. The effect of dexamethasone on sleep: preliminary results in eleven patients. *Biol Psychiatry*, 19 (5):771-775.
- Feng P, Ma Y, Vogel GW. 2001. Ontogeny of REM rebound in postnatal rats. *Sleep*, 24 (6):645-653.
- Field T, Diego M, Hernandez-Reif M, Schanberg S, Kuhn C, Yando R, Bendell D. 2003. Pregnancy anxiety and comorbid depression and anger: effects on the fetus and neonate. *Depress Anxiety*, 17 (3):140-151.
- Follenius M, Brandenberger G, Bandesapt JJ, Libert JP, Ehrhart J. 1992. Nocturnal cortisol release in relation to sleep structure. *Sleep*, 15 (1):21-27.
- Francesconi W, Muller CM, Singer W. 1988. Cholinergic mechanisms in the reticular control of transmission in the cat lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol*, 59 (6):1690-1718.
- Frank MG, Heller HC. 1997. Development of REM and slow wave sleep in the rat. *Am J Physiol*, 272 (6 Pt 2):R1792-1799.
- Frank MG, Heller HC. 2003. The ontogeny of mammalian sleep: a reappraisal of alternative hypotheses. *J Sleep Res*, 12 (1):25-34.
- Frasch MG, Muller T, Wicher C, Weiss C, Lohle M, Schwab K, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2007. Fetal body weight and the development of the control of the cardiovascular system in fetal sheep. *J Physiol*, 579 (Pt 3):893-907.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. 1999. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol*, 180 (1 Pt 1):114-121.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP. 2004. Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am J Obstet Gynecol*, 190 (3):588-595.
- Friess E, Wiedemann K, Steiger A, Holsboer F. 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and sleep in man. *Adv Neuroimmunol*, 5 (2):111-125.
- Friess E, U VB, Wiedemann K, Lauer CJ, Holsboer F. 1994. Effects of pulsatile cortisol infusion on sleep-EEG and nocturnal growth hormone release in healthy men. *J Sleep Res*, 3 (2):73-79.
- Frusca T, Soregaroli M, Valcamonico A, Scalvi L, Bonera R, Bianchi U. 2001. Effect of betamethasone on computerized cardiotocographic parameters in preterm growth-restricted fetuses with and without cerebral vasodilation. *Gynecol Obstet Invest*, 52 (3):194-197.

- Gao J, Zheng Z. 1994. Direct dynamical test for deterministic chaos and optimal embedding of a chaotic time series. *Physical Review E Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 49 (5):3807-3814.
- Gatford KL, Owens JA, Li S, Moss TJ, Newnham JP, Challis JR, Sloboda DM. 2008. Repeated betamethasone treatment of pregnant sheep programs persistent reductions in circulating IGF-I and IGF-binding proteins in progeny. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295 (1):E170-178.
- Gertner S, Greenbaum CW, Sadeh A, Dolfin Z, Sirota L, Ben-Nun Y. 2002. Sleep-wake patterns in preterm infants and 6 month's home environment: implications for early cognitive development. *Early Hum Dev*, 68 (2):93-102.
- Gillespie CF, Nemeroff CB. 2005. Hypercortisolemia and depression. *Psychosom Med*, 67 Suppl 1:S26-28.
- Gillin JC, Jacobs LS, Fram DH, Snyder F. 1972. Acute effect of a glucocorticoid on normal human sleep. *Nature*, 237 (5355):398-399.
- Globus GG. 1970. Quantification of the REM sleep cycle as a rhythm. *Psychophysiology*, 7 (2):248-253.
- Gold PW, Chrousos GP. 2002. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry*, 7 (3):254-275.
- Grier DG, Halliday HL. 2004. Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development. *Treat Respir Med*, 3 (5):295-306.
- Grieve PG, Myers MM, Stark RI. 1994. Behavioral states in the fetal baboon. *Early Hum Dev*, 39 (3):159-175.
- Gronfier C, Chapotot F, Brandenberger G. 1998. Cortisol secretory rates and EEG delta activity are controlled by two coupled but independent generators. *Am J Physiol, (Endocrinol Metab. 38):E94 -E100.*
- Gronfier C, Luthringer R, Follenius M, Schaltenbrand N, Macher JP, Muzet A, Brandenberger G. 1997. Temporal relationships between pulsatile cortisol secretion and electroencephalographic activity during sleep in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 103 (3):405-408.
- Guijarro C, Rutz S, Rothmaier K, Turiault M, Zhi Q, Naumann T, Frotscher M, Tronche F, Jackisch R, Kretz O. 2006. Maturation and maintenance of cholinergic medial septum neurons require glucocorticoid receptor signaling. *J Neurochem*, 97 (3):747-758.
- Gumbinas M, Oda M, Huttenlocher P. 1973. The effects of corticosteroids on myelination of the developing rat brain. *Biol Neonate*, 22 (5):355-366.
- Guyton AC. 1987. *Basic Neuroscience*. 1te Aufl. Philadelphia: Saunders.
- Halpern L, MacLean W, Baumeister A. 1995. Infant sleep-wake characteristics: Relation to neurological status and the prediction of developmental outcome. *Dev Rev*, 15:255-291.
- Hamburger V. 1975. Fetal behavior. In: Hafez ES, Hrsg. *The Mammalian Fetus: Comparative Biology and Methodology*. Aufl. Springfield: Springfield, 69-81.
- Hanley NR, Van de Kar LD. 2003. Serotonin and the neuroendocrine regulation of the hypothalamic--pituitary-adrenal axis in health and disease. *Vitam Horm*, 66:189-255.
- Harper RM, Frostig Z, Taube D, Hoppenbrouwers T, Hodgman JE. 1983. Development of sleep-waking temporal sequencing in infants at risk for the Sudden Infant Death Syndrome. *Exp Neurol*, 79 (3):821-829.
- Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF. 1996. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol*, 140 (1):43-52.
- Hemmelmann C, Horn M, Susse T, Vollandt R, Weiss S. 2005. New concepts of multiple tests and their use for evaluating high-dimensional EEG data. *J Neurosci Methods*, 142: 209-217.

- Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple testing procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6:65-70.
- Honma S, Honma KI, Shirakawa T, Hiroshige T. 1984. Effects of elimination of maternal circadian rhythms during pregnancy on the postnatal development of circadian corticosterone rhythm in blinded infantile rats. *Endocrinology*, 114 (1):44-50.
- Hoppenbrouwers T, Serman MB. 1975. Development of sleep state patterns in the kitten. *Exp Neurol*, 49 (3):822-838.
- Howard E. 1973. Increased reactivity and impaired adaptability in operant behavior of adult mice given corticosterone in infancy. *J Comp Physiol Psychol*, 85 (1):211-220.
- Howard E, Benjamins JA. 1975. DNA, ganglioside and sulfatide in brains of rats given corticosterone in infancy, with an estimate of cell loss during development. *Brain Res*, 92 (1):73-87.
- Hua SY, Chen YZ. 1989. Membrane receptor-mediated electrophysiological effects of glucocorticoid on mammalian neurons. *Endocrinology*, 124 (2):687-691.
- Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2001. Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci*, 19 (4):415-425.
- Huang WL, Beazley LD, Quinlivan JA, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 1999. Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynecol*, 94 (2):213-218.
- Hubain PP, Staner L, Dramaix M, Kerkhofs M, Papadimitriou G, Mendlewicz J, Linkowski P. 1998. The dexamethasone suppression test and sleep electroencephalogram in nonbipolar major depressed inpatients: a multivariate analysis. *Biol Psychiatry*, 43 (3):220-229.
- Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK. 2004. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull*, 130:115-142.
- Ikegami M, Jobe AH, Newnham J, Polk DH, Willet KE, Sly P. 1997. Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med*, 156 (1):178-184.
- Inder TE, Warfield SK, Wang H, Huppi PS, Volpe JJ. 2005. Abnormal cerebral structure is present at term in premature infants. *Pediatrics*, 115 (2):286-294.
- Isobe Y, Isobe M. 1998. Circadian rhythm of Arg-vasopressin contents in the suprachiasmatic nucleus in relation to corticosterone. *Brain Res*, 800 (1):78-85.
- Iwamura Y, Tsuda K, Kudo N, Kohama K. 1968. Monosynaptic reflex during natural sleep in the kitten. *Brain Res*, 11 (2):456-459.
- Jackson JR, Kleeman S, Doerzbacher M, Lambers DS. 2003. The effect of glucocorticosteroid administration on fetal movements and biophysical profile scores in normal pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 13 (1):50-53.
- Jeong J, Joung MK, Kim SY. 1997. Quantification of emotion by nonlinear analysis of the chaotic dynamics of electroencephalogram during perception of 1/f music. *Biol Cybern*, 78:217-225.
- Jeong J, Kim SY, Han SH. 1998. Non-linear dynamical analysis of the EEG in Alzheimer's disease with optimal embedding dimension. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 106 (3):220-228.
- Jobe AH. 2001. Glucocorticoids, inflammation and the perinatal lung. *Semin Neonatol*, 6 (4):331-342.
- Jobe AH, Wada N, Berry LM, Ikegami M, Ervin MG. 1998. Single and repetitive maternal glucocorticoid exposures reduce fetal growth in sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 178 (5):880-885.
- Joels M. 2000. Modulatory actions of steroid hormones and neuropeptides on electrical activity in brain. *Eur J Pharmacol*, 405 (1-3):207-216.
- Joels M. 2001. Corticosteroid actions in the hippocampus. *J Neuroendocrinol*, 13 (8):657-669.
- Joels M, de Kloet ER. 1992. Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci*, 15 (1):25-30.

- Joels M, de Kloet ER. 1994. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol*, 43 (1):1-36.
- Johnson JW, Mitzner W, Beck JC, London WT, Sly DL, Lee PA, Khouzami VA, Cavalieri RL. 1981. Long-term effects of betamethasone on fetal development. *Am J Obstet Gynecol*, 141 (8):1053-1064.
- Jones BE. 2004. Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res*, 145:157-169.
- Jouvet-Mounier D, Astic L, Lacote D. 1970. Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Dev Psychobiol*, 2 (4):216-239.
- Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol*, 572 (Pt 1):31-44.
- Karst H, Wadman WJ, Joels M. 1993. Long-term control by corticosteroids of the inward rectifier in rat CA1 pyramidal neurons, in vitro. *Brain Res*, 612 (1-2):172-179.
- Kennaway DJ. 2000. Melatonin and development: physiology and pharmacology. *Semin Perinatol*, 24 (4):258-266.
- Kerr DS, Campbell LW, Thibault O, Landfield PW. 1992. Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca²⁺ conductances: relevance to brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (18):8527-8531.
- King S, Laplante DP. 2005. The effects of prenatal maternal stress on children's cognitive development: Project Ice Storm. *Stress*, 8 (1):35-45.
- Kraemer HC, Hole WT, Anders TF. 1984. The detection of behavioral state cycles and classification of temporal structure in behavioral states. *Sleep*, 7 (1):3-17.
- Kryger MH. 2005. Principles and Practice of Sleep Medicine. Aufl. Elsevier Science Health Science div.
- Larsen PJ, Vrang N, Moller M, Jessop DS, Lightman SL, Chowdrey HS, Mikkelsen JD. 1994. The diurnal expression of genes encoding vasopressin and vasoactive intestinal peptide within the rat suprachiasmatic nucleus is influenced by circulating glucocorticoids. *Brain Res Mol Brain Res*, 27 (2):342-346.
- Lauder JM, Bloom FE. 1974. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol*, 155 (4):469-481.
- Leonard BE. 2005. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *Eur Psychiatry*, 20 Suppl 3:S302-306.
- Lesage J, Dufourny L, Laborie C, Bernet F, Blondeau B, Avril I, Breant B, Dupouy JP. 2002. Perinatal malnutrition programs sympathoadrenal and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress in adult male rats. *J Neuroendocrinol*, 14 (2):135-143.
- Leviton A, Kuban KC, Pagano M, Allred EN, Van Marter L. 1993. Antenatal corticosteroids appear to reduce the risk of postnatal germinal matrix hemorrhage in intubated low birth weight newborns. *Pediatrics*, 91 (6):1083-1088.
- Liggins GC. 1969. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol*, 45 (4):515-523.
- Liggins GC, Howie RN. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*, 50 (4):515-525.
- Liu RY, Unmehopa UA, Zhou JN, Swaab DF. 2006. Glucocorticoids suppress vasopressin gene expression in human suprachiasmatic nucleus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 98 (4-5):248-253.
- Lombroso CT. 2004. Neonatal EEG polygraphy in normal and abnormal newborns. In: Niedermeyer E, Lopes da Silva F, Hrsg. *Electroencephalography*. Aufl. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 803-875.

- Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB. 2000. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci*, 20 (10):3830-3842.
- Lunshof S, Boer K, Wolf H, van Hoffen G, Bayram N, Mirmiran M. 1998. Fetal and maternal diurnal rhythms during the third trimester of normal pregnancy: outcomes of computerized analysis of continuous twenty-four-hour fetal heart rate recordings. *Am J Obstet Gynecol*, 178 (2):247-254.
- Lupien SJ, McEwen BS. 1997. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev*, 24 (1):1-27.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. 2007. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn*.
- Lydic R, Baghdoyan H. 1999. Handbook of behavioral state control. Aufl. Boca Raton.
- MacArthur BA, Howie RN, Dezoete JA, Elkins J. 1982. School progress and cognitive development of 6-year-old children whose mothers were treated antenatally with betamethasone. *Pediatrics*, 70 (1):99-105.
- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev*, 27 (1-2):119-127.
- Magyar DM, Fridshal D, Elsner CW, Glatz T, Eliot J, Klein AH, Lowe KC, Buster JE, Nathanielsz PW. 1980. Time-trend analysis of plasma cortisol concentrations in the fetal sheep in relation to parturition. *Endocrinology*, 107 (1):155-159.
- Martin CB, Jr. 1981. Behavioral states in the human fetus. *J Reprod Med*, 26 (8):425-432.
- Matthews SG. 2000. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res*, 47 (3):291-300.
- Matthews SG. 2002. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab*, 13 (9):373-380.
- McCormick DA, Pape HC. 1988. Acetylcholine inhibits identified interneurons in the cat lateral geniculate nucleus. *Nature*, 334 (6179):246-248.
- McCormick DA, Bal T. 1997. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci*, 20:185-215.
- McEwen BS. 1994. Steroid hormone actions on the brain: when is the genome involved? *Horm Behav*, 28 (4):396-405.
- McGinty DJ, Drucker-Colin RR. 1982. Sleep mechanisms: biology and control of REM sleep. *Int Rev Neurobiol*, 23:391-436.
- McMillen IC, Nowak R. 1989a. Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *J Endocrinol*, 120 (3):459-464.
- McMillen IC, Nowak R. 1989b. Fetal diurnal rhythms: signal or noise? In: Reppert SM, Hrsg. *Advances in fetal physiology*. Aufl. Ithaca: Perinatology Press, 341-357.
- McMillen IC, Thorburn GD, Walker DW. 1987. Diurnal variations in plasma concentrations of cortisol, prolactin, growth hormone and glucose in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *J Endocrinol*, 114 (1):65-72.
- McNerney ME, Szeto HH. 1990. Automated identification and quantitation of four patterns of electrocortical activity in the near-term fetal lamb. *Pediatr Res*, 28 (2):106-110.
- Meadow WL, Bell A, Sunstein CR. 2003. Statistics, not memories: what was the standard of care for administering antenatal steroids to women in preterm labor between 1985 and 2000? *Obstet Gynecol*, 102:356-362.
- Meaney MJ, Szyf M. 2005. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues Clin Neurosci*, 7 (2):103-123.
- Meyer-Bahlburg HF, Dolezal C, Baker SW, Carlson AD, Obeid JS, New MI. 2004. Cognitive and motor development of children with and without congenital adrenal hyperplasia after early-prenatal dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab*, 89 (2):610-614.

- Micheloyannis S, Arvanitis S, Papanikolaou E, Stam CJ. 1998a. Electroencephalographic signal analysis and desynchronization effect caused by two differing mental arithmetic skills. *Clin Electroencephalogr*, 29 (1):10-15.
- Micheloyannis S, Flitzanis N, Papanikolaou E, Bourkas M, Terzakis D, Arvanitis S, Stam CJ. 1998b. Usefulness of non-linear EEG analysis. *Acta Neurol Scand*, 97 (1):13-19.
- Mirescu C, Gould E. 2006. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16 (3):233-238.
- Mirmiran M, Lunshof S. 1996. Perinatal development of human circadian rhythms. *Prog Brain Res*, 111:217-226.
- Mirmiran M, Baldwin RB, Ariagno RL. 2003a. Circadian and sleep development in preterm infants occurs independently from the influences of environmental lighting. *Pediatr Res*, 53 (6):933-938.
- Mirmiran M, Maas YG, Ariagno RL. 2003b. Development of fetal and neonatal sleep and circadian rhythms. *Sleep Med Rev*, 7 (4):321-334.
- Mirmiran M, van de Poll NE, Corner MA, van Oyen HG, Bour HL. 1981. Suppression of active sleep by chronic treatment with chlorimipramine during early postnatal development: effects upon adult sleep and behavior in the rat. *Brain Res*, 204 (1):129-146.
- Modi N, Lewis H, Al-Naqeeb N, Ajayi-Obe M, Dore CJ, Rutherford M. 2001. The effects of repeated antenatal glucocorticoid therapy on the developing brain. *Pediatr Res*, 50 (5):581-585.
- Moore FL, Orchinik M, Lowry C. 1995. Functional studies of corticosterone receptors in neuronal membranes. *Receptor*, 5 (1):21-28.
- Moss TJ, Doherty DA, Nitsos I, Sloboda DM, Harding R, Newnham JP. 2005. Effects into adulthood of single or repeated antenatal corticosteroids in sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 192 (1):146-152.
- Mulder EJ, Derks JB, Visser GH. 1997. Antenatal corticosteroid therapy and fetal behaviour: a randomised study of the effects of betamethasone and dexamethasone. *Br J Obstet Gynaecol*, 104 (11):1239-1247.
- Mulder EJ, Derks JB, Visser GH. 2004. Effects of antenatal betamethasone administration on fetal heart rate and behavior in twin pregnancy. *Pediatr Res*, 56 (1):35-39.
- Mulder EJ, Derks JB, Zonneveld MF, Bruinse HW, Visser GH. 1994. Transient reduction in fetal activity and heart rate variation after maternal betamethasone administration. *Early Hum Dev*, 36 (1):49-60.
- Mulder EJ, Robles de Medina PG, Huizink AC, Van den Bergh BR, Buitelaar JK, Visser GH. 2002. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Hum Dev*, 70 (1-2):3-14.
- Multon O, Senat MV, Minoui S, Hue MV, Frydman R, Ville Y. 1997. Effect of antenatal betamethasone and dexamethasone administration on fetal heart rate variability in growth-retarded fetuses. *Fetal Diagn Ther*, 12 (3):170-177.
- Murphy BP, Inder TE, Huppi PS, Warfield S, Zientara GP, Kikinis R, Jolesz FA, Volpe JJ. 2001. Impaired cerebral cortical gray matter growth after treatment with dexamethasone for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics*, 107 (2):217-221.
- Nathanielsz PW, Bailey A, Poore ER, Thorburn GD, Harding R. 1980. The relationship between myometrial activity and sleep state and breathing in fetal sheep throughout the last third of gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 138 (6):653-659.
- Newnham JP. 2001. Is prenatal glucocorticoid administration another origin of adult disease? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28 (11):957-961.
- Newnham JP, Evans SF, Godfrey M, Huang W, Ikegami M, Jobe A. 1999. Maternal, but not fetal, administration of corticosteroids restricts fetal growth. *J Matern Fetal Med*, 8 (3):81-87.
- Niedermeyer E. 2004. The normal EEG of the waking adult. In: Niedermeyer E, Lopes da Silva F, Hrsg. *Electroencephalography*. 5te Aufl. Baltimore: Williams and Wilkins, 97-117.

- NIH. 1995. Consensus Development Panel: Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. *Jama*, 273 (5):413-418.
- NIH. 2000. Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses. NIH Consensus Statement, 17 (2):1-18.
- Nijhuis JG, Prechtl HF, Martin CB, Jr., Bots RS. 1982. Are there behavioural states in the human fetus? *Early Hum Dev*, 6 (2):177-195.
- Norman LJ, Lye SJ, Wlodek ME, Challis JR. 1985. Changes in pituitary responses to synthetic ovine corticotrophin releasing factor in fetal sheep. *Can J Physiol Pharmacol*, 63 (11):1398-1403.
- O'Connor TG, Heron J, Golding J, Beveridge M, Glover V. 2002. Maternal antenatal anxiety and children's behavioural/emotional problems at 4 years. Report from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Br J Psychiatry*, 180:502-508.
- Okai T, Kozuma S, Shinozuka N, Kuwabara Y, Mizuno M. 1992. A study on the development of sleep-wakefulness cycle in the human fetus. *Early Hum Dev*, 29 (1-3):391-396.
- Pace-Schott EF, Hobson JA. 2002. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci*, 3 (8):591-605.
- Packan DR, Sapolsky RM. 1990. Glucocorticoid endangerment of the hippocampus: tissue, steroid and receptor specificity. *Neuroendocrinology*, 51 (6):613-618.
- Padbury JF, Polk DH, Ervin MG, Berry LM, Ikegami M, Jobe AH. 1995. Postnatal cardiovascular and metabolic responses to a single intramuscular dose of betamethasone in fetal sheep born prematurely by cesarean section. *Pediatr Res*, 38 (5):709-715.
- Palus M. 1996. Nonlinearity in normal human EEG: cycles, temporal asymmetry, nonstationarity and randomness, not chaos. *Biol Cybern*, 75 (5):389-396.
- Pariante CM. 2003. Depression, stress and the adrenal axis. *J Neuroendocrinol*, 15 (8):811-812.
- Pariante CM. 2004. Glucocorticoid receptor function in vitro in patients with major depression. *Stress*, 7 (4):209-219.
- Pariante CM, Miller AH. 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, 49 (5):391-404.
- Parker KJ, Schatzberg AF, Lyons DM. 2003. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm Behav*, 43 (1):60-66.
- Parkes MJ. 1992. Fetal behavioural states: sleep and wakefulness? *Q J Exp Psychol B*, 44 (3-4):231-244.
- Parmelee AH, Jr., Wenner WH, Akiyama Y, Schultz M, Stern E. 1967. Sleep states in premature infants. *Dev Med Child Neurol*, 9 (1):70-77.
- Parraguez VH, Vergara M, Riquelme R, Raimann R, Llanos AJ, Seron-Ferre M. 1989. Ontogeny of the circadian rhythm of cortisol in sheep. *Biol Reprod*, 40 (6):1137-1143.
- Pavlidis C, Watanabe Y, Magarinos AM, McEwen BS. 1995. Opposing roles of type I and type II adrenal steroid receptors in hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience*, 68 (2):387-394.
- Piazzze J, Ruozzi-Berretta A, Di Cioccio A, Anceschi M. 2005. Neonatal length and cranial circumference are reduced in human pregnancies at term after antepartum administration of betamethasone. *J Perinat Med*, 33 (5):463-464.
- Pieretti S, Di Giannuario A, Loizzo A, Sagratella S, Scotti de Carolis A, Capasso A, Sorrentino L. 1992. Dexamethasone prevents epileptiform activity induced by morphine in in vivo and in vitro experiments. *J Pharmacol Exp Ther*, 263 (2):830-839.
- Poland RE, McCracken JT, Lutchmansingh P, Tondo L. 1992. Relationship between REM sleep latency and nocturnal cortisol concentrations in depressed patients. *J Sleep Res*, 1 (1):54-57.

- Polyakov A, Cohen S, Baum M, Trickey D, Jolley D, Wallace EM. 2007. Patterns of antenatal corticosteroid prescribing 1998-2004. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 47:42-45.
- Prechtl HF. 1985. Ultrasound studies of human fetal behaviour. *Early Hum Dev*, 12 (2):91-98.
- Pritchard WS, Duke DW, Kriebel KK. 1995. Dimensional analysis of resting human EEG. II: Surrogate-data testing indicates nonlinearity but not low-dimensional chaos. *Psychophysiology*, 32 (5):486-491.
- Puro DG. 1983. Glucocorticoid regulation of synaptic development. *Brain Res*, 284 (2-3):283-290.
- Quinlivan JA, Beazley LD, Archer M, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2001. Repeated prenatal corticosteroids reduce glial fibrillary acidic protein in the ovine central nervous system. *J Perinat Med*, 30 (3):209-219.
- Recabarren SE, Vergara M, Llanos AJ, Seron-Ferre M. 1987. Circadian variation of rectal temperature in newborn sheep. *J Dev Physiol*, 9 (5):399-408.
- Rechtschaffen A. 1998. Current perspectives on the function of sleep. *Perspect Biol Med*, 41 (3):359-390.
- Reppert SM. 1992. Prenatal development of a hypothalamic biological clock. In: Swaab DF, Hofmann MA, Mirmiran M, Ravid R, Van Leeuwen FW, Hrsg. *The human hypothalamus in health and disease*. Aufl. *Prog Brain Res*,
- Reppert SM, Schwartz WJ. 1986. Maternal endocrine extirpations do not abolish maternal coordination of the fetal circadian clock. *Endocrinology*, 119 (4):1763-1767.
- Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA. 1988. Maternal communication of circadian phase to the developing mammal. *Psychoneuroendocrinology*, 13 (1-2):63-78.
- Rivkees SA. 2003. Developing circadian rhythmicity in infants. *Pediatr Endocrinol Rev*, 1 (1):38-45.
- Roffwarg HP, Muzio JN, Dement WC. 1966. Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science*, 152:604-619.
- Röschke J, Mann K, Fell J. 1994. Nonlinear EEG dynamics during sleep in depression and schizophrenia. *Neuroscience*, 75:271-284.
- Ruckebusch Y. 1972. Development of sleep and wakefulness in the foetal lamb. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32 (2):119-128.
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*, 10 (9):2897-2902.
- Sarnthein J, Abarbanel HD, Pockberger H. 1998. Nonlinear analysis of epileptic activity in rabbit neocortex. *Biol Cybern*, 78 (1):37-44.
- Sauer TJAY, Casdagli MJSP-. 1991. Embeddology. *J Stat Phys*, 65:579-616.
- Scher MS. 1997. Neurophysiological assessment of brain function and maturation. II. A measure of brain dysmaturity in healthy preterm neonates. *Pediatr Neurol*, 16 (4):287-295.
- Scher MS, Steppe D, Banks D. 1994. Lower neurodevelopmental performance at 2 years in healthy preterm neonates. *Pediatric Neurology*, 11(2):121-122.
- Scher MS, Johnson MW, Holditch-Davis D. 2005. Cyclicity of neonatal sleep behaviors at 25 to 30 weeks' postconceptional age. *Pediatr Res*, 57 (6):879-882.
- Schleussner E, Arnscheidt C, Müller T, Schneider U, Haueisen J, Schwab K, Schwab M. 2004. Effects of antenatal glucocorticoids on human fetal cortical function detected by fetal magnetencephalography. *J Soc Gynecol Invest*, 11(Suppl.):69.
- Schmand B, Neuvel J, Smolders-de Haas H, Hoeks J, Treffers PE, Koppe JG. 1990. Psychological development of children who were treated antenatally with corticosteroids to prevent respiratory distress syndrome. *Pediatrics*, 86 (1):58-64.
- Schmidt K, Schwab M, Abrams R, Witte H. 1999. Nonlinear analysis of the fetal ECoG: predictability and bispectral measures. *Theory Bioscience*, 18:219-230.
- Schmidt K, Eiselt M, Schwab M, Bauer R, Hoyer D. 1997. The quality of the point prediction error to quantify and classify state changes. In: Witte H, Zwiener U,

- Schack B, Doering A, Hrsg. Quantitative and topological EEG and MEG analysis. 1te Aufl. Erlangen: Druckhaus Mayer, 263-266.
- Schmidt R, Thews G. 1997. Kortisolspiegelschwankungen. In: Schmidt RF, Thews G, Hrsg. Physiologie des Menschen. 27te Aufl. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 393-394.
- Schneider ML. 1992. Prenatal stress exposure alters postnatal behavioral expression under conditions of novelty challenge in rhesus monkey infants. *Dev Psychobiol*, 25 (7):529-540.
- Schumacher M. 1990. Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci*, 13 (9):359-362.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Zwiener U, Bauer R. 1998. Brain-derived peptides reduce the size of cerebral infarction and loss of MAP2 immunoreactivity after focal ischemia in rats. *J Neural Transm Suppl*, 53:299-311.
- Schwab M, Schmidt K, Witte H, Abrams M. 2000a. Investigation of nonlinear ECoG changes during spontaneous sleep state changes and cortical arousal in fetal sheep. *Cereb Cortex*, 10 (2):142-148.
- Schwab M, Coksaygan T, Witte OW, Nathanielsz PW. 2009. Exposure of fetal sheep to maternally administered glucocorticoids at 0.73 gestation augments fetal pituitary response to hypotensive stress two weeks later. *J Physiol* (in press).
- Schwab M, Wichmann G, Maurer I, Loehle M, Nathanielsz PW, Witte OW. 2006. Antenatal glucocorticoids suppress mitochondrial activity but do not decrease ATP content in the fetal ovine brain. *J Soc Gynecol Invest*, 13 (Suppl.):732.
- Schwab M, Schmidt K, Roedel M, Mueller T, Schubert H, Anwar MA, Nathanielsz PW. 2001a. Non-linear changes of electrocortical activity after antenatal betamethasone treatment in fetal sheep. *Journal of Physiology*, 531.2:535-543.
- Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Muller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, Nathanielsz W. 2000b. Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J Physiol*, 528 (Pt 3):619-632.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kuhn B, Muller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW. 2001b. Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol*, 530 (Pt 3):497-506.
- Scully JL, Otten U. 1995. Glucocorticoids, neurotrophins and neurodegeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52 (5):391-401.
- Seckl JR. 2004. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol*, 151 Suppl 3:U49-62.
- Seiler M, Schwab ME. 1984. Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. *Brain Res*, 300 (1):33-39.
- Selton D, Andre M, Hascoet JM. 2000. Normal EEG in very premature infants: reference criteria. *Clin Neurophysiol*, 111 (12):2116-2124.
- Senat MV, Minoui S, Multon O, Fernandez H, Frydman R, Ville Y. 1998. Effect of dexamethasone and betamethasone on fetal heart rate variability in preterm labour: a randomised study. *Br J Obstet Gynaecol*, 105 (7):749-755.
- Shi B, Rabin SJ, Brandoli C, Mocchetti I. 1998. Dexamethasone induces hypertrophy of developing medial septum cholinergic neurons: potential role of nerve growth factor. *J Neurosci*, 18 (22):9326-9334.
- Shimizu A, Himwich HE. 1968. The ontogeny of sleep in kittens and young rabbits. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 24 (4):307-318.
- Shinozuka N, Nathanielsz PW. 1998. Electrocortical activity in fetal sheep in the last seven days of gestation. *J Physiol*, 513 (Pt 1):273-281.
- Siegel JM. 2005. Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*, 437 (7063):1264-1271.
- Simonetta G, Walker DW, McMillen IC. 1991. Effect of feeding on the diurnal rhythm of plasma cortisol and adrenocorticotrophic hormone concentrations in the pregnant ewe and sheep fetus. *Exp Physiol*, 76 (2):219-229.

- Sloboda DM, Challis JR, Moss TJ, Newnham JP. 2005. Synthetic glucocorticoids: antenatal administration and long-term implications. *Curr Pharm Des*, 11 (11):1459-1472.
- Slotkin TA, Kreider ML, Tate CA, Seidler FJ. 2006. Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology*, 31 (5):904-911.
- Speirs HJ, Seckl JR, Brown RW. 2004. Ontogeny of glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoid susceptibility during development. *J Endocrinol*, 181 (1):105-116.
- Stam CJ. 2005. Nonlinear dynamical analysis of EEG and MEG: review of an emerging field. *Clin Neurophysiol*, 116 (10):2266-2301.
- Stam CJ, van Woerkom TC, Keunen RW. 1997. Non-linear analysis of the electroencephalogram in Creutzfeldt-Jakob disease. *Biol Cybern*, 77 (4):247-256.
- Stam CJ, Nicolai J, Keunen RW. 1998. Nonlinear dynamical analysis of periodic lateralized epileptiform discharges. *Clin Electroencephalogr*, 29 (2):101-105.
- Stark RI, Haiken J, Nordli D, Myers MM. 1991. Characterization of electroencephalographic state in fetal baboons. *Am J Physiol*, 261 (2 Pt 2):R496-500.
- Stark RI, Daniel SS, Kim YI, Leung K, Rey HR, Tropper PJ. 1993. Patterns of development in fetal breathing activity in the latter third of gestation of the baboon. *Early Hum Dev*, 32 (1):31-47.
- Steckler T, Holsboer F, Reul JM. 1999. Glucocorticoids and depression. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 13 (4):597-614.
- Steiger A. 2002. Sleep and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical system. *Sleep Med Rev*, 6 (2):125-138.
- Stein HM, Oyama K, Martinez A, Chappell BA, Buhl E, Blount L, Padbury JF. 1993. Effects of corticosteroids in preterm sheep on adaptation and sympathoadrenal mechanisms at birth. *Am J Physiol*, 264 (5 Pt 1):E763-769.
- Steriade M. 2003. The corticothalamic system in sleep. *Front Biosci*, 8:d878-899.
- Steriade M. 2004. Acetylcholine systems and rhythmic activities during the waking-sleep cycle. *Prog Brain Res*, 145:179-196.
- Steriade M. 2005. Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends Neurosci*, 28 (6):317-324.
- Steriade M, McCarley RW. 1990. Brainstem control of sleep and wakefulness. Aufl. New York: Plenum.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. 1993. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*, 262 (5134):679-685.
- Steriade M, Contreras D, Amzica F. 1994. Synchronized sleep oscillations and their paroxysmal developments. *Trends Neurosci*, 17 (5):199-208.
- Stores G. 2001. Sleep-wake function in children with neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Semin Pediatr Neurol*, 8 (4):188-197.
- Stott DH. 1973. Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. *Dev Med Child Neurol*, 15 (6):770-787.
- Sun X, Rusak B, Semba K. 2000. Electrophysiology and pharmacology of projections from the suprachiasmatic nucleus to the ventromedial preoptic area in rat. *Neuroscience*, 98 (4):715-728.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. 2005. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*, 4 (2):141-194.
- Szeto HH. 1990. Spectral edge frequency as a simple quantitative measure of the maturation of electrocortical activity. *Pediatr Res*, 27 (3):289-292.
- Szeto HH, Hinman DJ. 1985. Prenatal development of sleep-wake patterns in sheep. *Sleep*, 8 (4):347-355.
- Szeto HH, Vo TD, Dwyer G, Dogramajian ME, Cox MJ, Senger G. 1985. The ontogeny of fetal lamb electrocortical activity: a power spectral analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 153 (4):462-466.

- Takens F. 1981. Detecting strange attractors in turbulence. In: Rand D, Young L, Hrsg. *Dynamical systems in turbulence*. Aufl. New York: Springer, 366-381.
- Tangalakakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM. 1992. Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol*, 77 (5):709-717.
- Theiler J, Rapp PE. 1996. Re-examination of the evidence for low-dimensional, nonlinear structure in the human electroencephalogram. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 98 (3):213-222.
- Thorp JA, Jones PG, Knox E, Clark RH. 2002. Does antenatal corticosteroid therapy affect birth weight and head circumference? *Obstet Gynecol*, 99 (1):101-108.
- Tichomirowa MA, Keck ME, Schneider HJ, Paez-Pereda M, Renner U, Holsboer F, Stalla GK. 2005. Endocrine disturbances in depression. *J Endocrinol Invest*, 28 (1):89-99.
- Tsuno N, Besset A, Ritchie K. 2005. Sleep and depression. *J Clin Psychiatry*, 66 (10):1254-1269.
- Tucker RP. 1990. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Research Reviews*, 15:101-120.
- Tuor UI, Yager JY, Bascaramurty S, Del Bigio MR. 1997. Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in cerebral glucose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain. *J Neurochem*, 69 (5):1954-1963.
- Uluþinar E, Yucel F, Ortug G. 2006. The effects of prenatal stress on the Purkinje cell neurogenesis. *Neurotoxicol Teratol*, 28 (1):86-94.
- Umans JG, Cox MJ, Hinman DJ, Dogramajian ME, Senger G, Szeto HH. 1985. The development of electrocortical activity in the fetal and neonatal guinea pig. *Am J Obstet Gynecol*, 153 (4):467-471.
- Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM. 1990. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*, 53 (2):157-167.
- Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J. 1994. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav*, 28 (4):336-348.
- Van Cauter E, Refetoff S. 1985. Multifactorial control of the 24-hour secretory profiles of pituitary hormones. *J Endocrinol Invest*, 8 (4):381-391.
- Van den Bergh BR, Mulder EJ, Mennes M, Glover V. 2005. Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. *Neurosci Biobehav Rev*, 29 (2):237-258.
- Van Wassenaer A. 2005. Neurodevelopmental consequences of being born SGA. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2 (3):372-377.
- Vantini G, Schiavo N, Di Martino A, Polato P, Triban C, Callegaro L, Toffano G, Leon A. 1989. Evidence for a physiological role of nerve growth factor in the central nervous system of neonatal rats. *Neuron*, 3 (3):267-273.
- Vergara M, Parraguez VH, Riquelme R, Figueroa JP, Llanos AJ, Seron-Ferre M. 1989. Ontogeny of the circadian variation of plasma prolactin in sheep. *J Dev Physiol*, 11 (2):89-95.
- Vicedomini JP, Nonneman AJ, DeKosky ST, Scheff SW. 1985. Perinatal glucocorticoids alter dentate gyrus electrophysiology. *Brain Res Bull*, 15 (2):111-116.
- Vicedomini JP, Nonneman AJ, DeKosky ST, Scheff SW. 1986. Perinatal glucocorticoids disrupt learning: a sexually dimorphic response. *Physiol Behav*, 36 (1):145-149.
- Ville Y, Vincent Y, Tordjman N, Hue MV, Fernandez H, Frydman R. 1995. Effect of betamethasone on the fetal heart rate pattern assessed by computerized cardiotocography in normal twin pregnancies. *Fetal Diagn Ther*, 10 (5):301-306.
- Weaver DR, Reppert SM. 1987. Maternal-fetal communication of circadian phase in a precocious rodent, the spiny mouse. *Am J Physiol*, 253 (4 Pt 1):E401-409.
- Weinert D. 2005. Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol Int*, 22 (2):179-205.

- Weinstock M. 1997. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev*, 21 (1):1-10.
- Weinstock M. 2001. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol*, 65 (5):427-451.
- Weitzman ED, Zimmerman JC, Czeisler CA, Ronda J. 1983. Cortisol secretion is inhibited during sleep in normal man. *J Clin Endocrinol Metab*, 56 (2):352-358.
- Welberg LA, Seckl JR. 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol*, 13 (2):113-128.
- Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. 2001. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience*, 104 (1):71-79.
- Whitelaw A, Thoresen M. 2000. Antenatal steroids and the developing brain. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 83 (2):F154-157.
- Whitney MP, Thoman EB. 1993. Early sleep patterns of premature infants are differentially related to later developmental disabilities. *J Dev Behav Pediatr*, 14 (2):71-80.
- Wurts SW, Edgar DM. 2000. Circadian and homeostatic control of rapid eye movement (REM) sleep: promotion of REM tendency by the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 20 (11):4300-4310.
- Yeh TF, Lin YJ, Lin HC, al. e. 2004. Outcomes at school age after postnatal dexamethasone therapy for lung disease of prematurity. *N Engl J Med*, 350:1304-1313.
- Zahalka EA, Seidler FJ, Slotkin TA. 1993. Dexamethasone treatment in utero enhances neonatal cholinergic nerve terminal development in rat brain. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 81 (2):191-198.
- Zemdegs IZ, McMillen IC, Walker DW, Thorburn GD, Nowak R. 1988. Diurnal rhythms in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *Endocrinology*, 123 (1):284-289.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. habil. Matthias Schwab für die Überlassung des Themas. Seine unermüdliche intensive Begleitung und Beratung während der aufwendigen ECoG-Analysen und der Erstellung des Manuskriptes sowie seine Begeisterung für das Thema, seine Geduld und sein schier unermüdlicher Enthusiasmus haben in einem ganz erheblichen Maß zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch möchte ich Frau Dipl.-Math. Karin Schwab danken. Ohne Sie wäre die äußerst aufwendig Durchführung der nichtlinearen Analyse und die statistische Auswertung nicht möglich gewesen. Sie trug durch Ihre intensive und kritische Diskussion zu zentralen Fragen der Arbeit bei.

Herrn Dr. Schubert, Leiter des Institutes für Versuchstierkunde, und Dr. Thomas Müller möchte ich für die Bereitstellung der Versuchsanordnung, Ihrer Hilfe bei der Durchführung der Instrumentierungen der Schafe sowie der Ableitung und Aufzeichnung der Parameter danken.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie und allen Freunden die die lange Arbeit während der Datenanalyse und der Auswertung für diese Dissertation wohlwollend unterstützen.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

PD Dr. med. habil Matthias Schwab

Dipl.- Math. Karin Schwab

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Zwickau, den 06. Oktober 2009

Tobias Groh

9.3 Lebenslauf

Name: Tobias Groh

Geburtsdatum: 12. September 1979

Geburtsort: Zwickau

Familienstand: verheiratet

Schulbesuch: 09/1986 – 08/1992 Friedrich – Schiller – Oberschule Zwickau
09/1992 – 07/1998 Georgengymnasium Zwickau
07/1998 Abitur

Dienst: 08/1998 – 9/1999 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Kirchberg

Ausbildung: 10/1999 – 07/2006 Studium der Humanmedizin an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Berufliche Tätigkeit: seit 07/2006 Assistenzarzt für Innere Medizin am
Kreiskrankenhaus Altenburg GmbH

Grants: 10/2007 „Nachwuchsförderpreis Schlafforschung“ der
Deutschen Gesellschaft für Schlafmedizin (DGSM)

Zwickau, den 06. Oktober 2009

Tobias Grohh